

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Северский биофизический научный центр»
Федерального медико-биологического агентства

**В.В. Иванова, И.В. Мильто, А.Н. Дзюман,
О.Н. Серебрякова, Е.Д. Порохова, И.В. Суходоло**

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРАКТИКУМ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Томск
Издательство СибГМУ
2023

УДК 611(075.8)
ББК 28.706я73
Г 516

Авторы:

В.В. Иванова, И.В. Мильто, А.Н. Дзюман,
О.Н. Серебрякова, Е.Д. Порохова, И.В. Суходоло

Г 516 **Гистологический практикум: учебное пособие /**
В.В. Иванова [и др.]. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2023. – 81 с.

В учебном пособии в краткой форме изложен материал, необходимый для освоения наиболее часто применяемых на практике методов гистологической техники. Каждая тема сопровождается практическим заданием и заданиями для самостоятельной проверки знаний.

Учебное пособие «Гистологический практикум» подготовлено по программе практики «Ознакомительная практика» в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего профессионального образования для студентов 2-го курса, обучающихся по основной образовательной программе специалитета по направлению подготовки: 30.05.02 – Медицинская биофизика.

УДК 611(075.8)
ББК 28.706я73

Рецензент:

М.В. Завьялова – доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск

Утверждено и рекомендовано к печати Учебно-методической комиссией Медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 30 сентября 2022 г.).

© Макет издательства СибГМУ, 2023
© В.В. Иванова, И.В. Мильто, А.Н. Дзюман,
О.Н. Серебрякова, Е.Д. Порохова, И.В. Суходоло, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
ТЕМА 1. Оснащение морфологической лаборатории	6
1.1. Устройство морфологической лаборатории	6
1.2. Специальное оборудование: назначение, принцип работы... 7	7
1.3. Общелабораторное оборудование.....	9
1.4. Вредные факторы при работе в морфологической лаборатории	10
ТЕМА 2. Знакомство с методикой приготовления гистологических препаратов	14
2.1. Цель гистологического исследования	14
2.2. Основные этапы приготовления гистологических препаратов	14
ТЕМА 3. Приготовление основных растворов для пробоподготовки биологического материала к гистологическому исследованию	19
3.1. Приготовление растворов и реактивов для фиксации, проводки и заливки образцов биологического материала ...	19
3.2. Приготовление растворов и расходных материалов для окраски и заключения гистологических срезов.....	20
ТЕМА 4. Взятие биологического материала и его фиксация	26
4.1. Выведение лабораторных животных из эксперимента.....	26
4.2. Особенности взятия органов для гистологического исследования	29
4.3. Подбор фиксирующей жидкости	30
ТЕМА 5. Промывка, вырезка и проводка биологического материала	35
5.1. Вырезка фрагментов биологического материала	35
5.2. Промывка фрагментов биологического материала	36
5.3. Проводка фрагментов биологического материала	36
ТЕМА 6. Формирование парафиновых блоков	42
6.1. Перенос образцов биологического материала в формы для заливки	42
6.2. Заливка образцов биологического материала в парафин	43
6.3. Изготовление парафинового блока	43

ТЕМА 7. Микротомия	48
7.1. Виды гистологических срезов	48
7.2. Техника микротомии	49
7.3. Перенос парафиновых срезов на предметное стекло.....	51
ТЕМА 8. Окраска гистологических срезов гематоксилином и эозином	57
8.1. Подготовка парафиновых срезов к окрашиванию	57
8.2. Окраска депарафинизированных срезов гематоксилином и эозином	58
8.3. Заключение окрашенных срезов	60
ТЕМА 9. Микроскопия гистологических препаратов	65
9.1. Подготовка к работе светового микроскопа	65
9.2. Алгоритм описания структуры органов	66
Эталоны ответов на ситуационные задачи	72
Эталоны ответов на тестовые задания	77
Рекомендуемая литература.....	80

ВВЕДЕНИЕ

Высокое качество гистологических препаратов является важнейшим условием достоверности результатов морфологических исследований. Серьезную проблему в гистологической технике представляют артефакты, которые могут осложнять интерпретацию результатов вплоть до полной потери их ценности. Понимание сути методик, используемых в морфологических лабораториях, способствует изготовлению гистологических препаратов высокого качества.

Пособие позволяет понять принципы, лежащие в основе гистологического метода исследования; убедиться, что все манипуляции, проводимые с образцом биологического материала на этапе пробоподготовки, повлияют на дальнейшее его изучение с помощью микроскопа.

ТЕМА 1

ОСНАЩЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

*Мы сами творцы в горящем гимне –
шуме фабрики и лаборатории.*

В. Маяковский. Облако в штанах

- 1.1. Устройство морфологической лаборатории.
- 1.2. Специальное оборудование: назначение, принцип работы.
- 1.3. Общелабораторное оборудование.
- 1.4. Вредные факторы при работе в морфологической лаборатории.

1.1. Устройство морфологической лаборатории

Работа морфологической лаборатории направлена на получение и анализ гистологических и цитологических препаратов, клеточных культур.

Морфологическая лаборатория представлена типовыми помещениями (помещения для вырезки, проводки и нарезки биологических образцов, моечная); кроме того, специальные помещения необходимы для проведения работ с экспериментальными животными (виварий, операционная), культурами клеток (асептические боксы), электронно-микроскопического исследования. Рабочие помещения морфологической лаборатории должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией.

Морфологическая лаборатория должна быть оснащена необходимым специальным и общелабораторным оборудованием. На сегодняшний день производители предлагают широкий спектр оборудования для морфологических лабораторий. Стоит отметить, что некоторое оборудование является обязательным (например, микротом и микроскоп), без него гистологическое исследование невозможно. Некоторое оборудование является факультативным: без него вполне можно обойтись при условии небольшого потока материала в лабора-

тории. Автоматизация не только позволяет оптимизировать время- и трудозатраты, но и призвана стандартизировать морфологические исследования.

Ведение учетной документации позволяет сотрудникам морфологической лаборатории эффективно использовать рабочее время и оптимизирует работу с архивным материалом.

1.2. Специальное оборудование: назначение, принцип работы

Для вырезки материала наличие специального оборудования не обязательно. Однако, существуют специальные столы и доски для вырезки материала. Доска для вырезки позволяет получить образцы тканей стандартной формы и толщины. Получение образца нужной толщины (в диапазоне 1,5–3,0 мм) контролируется глубиной отсеков доски для вырезки.

Существуют принтеры для маркировки гистологических кассет и предметных стекол. Автоматическая маркировка химически устойчивыми чернилами позволяет исключить повреждение маркировки реагентами, ускорить процесс маркировки, облегчить чтение маркировки. Автоматическая маркировка штрих-кодами применяется в случае последующего использования сканирующих микроскопов. В отсутствие принтера маркировку осуществляют вручную, карандашом, четким и понятным почерком.

Для автоматической проводки биологического материала используют гистопроцессоры. Все гистологические процессоры минимизируют контакт лаборанта с реагентами (формалин, ксилол). Гистопроцессоры характеризуются высокой производительностью (до 300 образцов за цикл), их использование целесообразно при большом количестве биологического материала. В гистопроцессорах используются различные методики для ускорения проводки: обработка гистологического материала микроволнами, чередование режимов вакуума и повышенного давления. Проводку биологического материала при условии небольшой загрузки лаборатории можно осуществлять вручную.

Специальным оборудованием для заливки образцов является заливочная станция. Заливочная станция имеет подогреваемую рабочую поверхность (диапазон температур от +50 до +70 °С), дозатор для парафина, охлаждающую поверхность (диапазон температур от -5 до +7 °С). Существуют полностью автоматизированные аппараты заливки парафиновых блоков. Заливку образцов можно проводить без специального оборудования.

Микротом – прибор, предназначенный для изготовления срезов тканей толщиной до 1 мкм (тонкие срезы). Микротомы бывают санные и ротационные; ручные, полуавтоматические и автоматические. Основными частями микротома являются: корпус, держатель объекта, держатель микротомного ножа, подающий механизм. Держатель объекта необходим для прочной фиксации колодки с блоком. Держатель ножа позволяет прочно зафиксировать лезвие микротомного ножа под определенным углом. Устанавливается различный угол наклона ножа в зависимости от характера объекта. Подающий механизм обеспечивает смещение объекта на заданное расстояние (мкм) относительно микротомного ножа. Благодаря работе подающего механизма микротом позволяет делать последовательные (серийные) срезы заданной толщины. В санных микротомов относительно неподвижного объекта двигается нож. В ротационных микротомов относительно неподвижного микротомного ножа изменяет положение объект. Стоит отметить, что даже микротомия с помощью автоматических микротомов требует участия лаборанта-гистолога.

Ультратом – прибор, предназначенный для изготовления срезов тканей толщиной менее 1 мкм (полутонкие и ультратонкие срезы). Ультратом позволяет получить срезы для трансмиссионного электронномикроскопического исследования.

Криостат – термостат, используемый для поддержания низкой температуры (-20 °С). С помощью микротома, помещенного в криостат (микротом-криостат), можно получать срезы замороженных образцов биологического материала.

Стейнер – аппарат для автоматической окраски гистологических срезов. Существуют и аппараты для автоматического заключения

окрашенных гистологических срезов или мазков под пленку или под покровное стекло – каверы. Оборудование для автоматического окрашивания и автоматического заключения гистологических срезов можно совместить в единый аппаратный комплекс. Окрашивание и заключение гистологических срезов можно проводить без специального оборудования.

Все манипуляции с клеточными культурами выполняют в ламинарном шкафу. Ламинарный шкаф или бокс абактериальной воздушной среды используется для предотвращения загрязнения биологических образцов в процессе работы. В бокс ламинарным потоком подается стерильный воздух, прошедший через фильтры грубой и тонкой очистки.

Культивирование эукариотических клеток осуществляется в CO₂-инкубаторе, который позволяет поддерживать постоянные условия (температуру, влажность и парциальное давление CO₂) для культивирования.

Основным условием работы с клетками является стерильность. Ежедневно, а также перед началом и по окончании работы проводится обработка оборудования для культивирования клеток дезинфицирующим моющим средством.

1.3. Общелабораторное оборудование

Микроскопы – это оптические приборы, позволяющие получить увеличенное изображение объекта, изучить детали его строения, лежащие за пределом разрешающей способности глаза. Разрешающая способность – это минимальное расстояние между двумя точками, на котором они распознаются как отдельные.

В морфологической лаборатории наиболее часто используют световые микроскопы для светлорольной микроскопии. Разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм.

В световом микроскопе можно выделить механическую и оптическую части. Механическая часть представлена штативом, тубусом, револьверным устройством для крепления и смены объективов,

предметным столиком, приспособлениями для крепления конденсора, механизмами для грубого («макроевент») и тонкого («микроевент») перемещения предметного столика или тубусодержателя (фокусировки). Оптическая часть представлена объективами, окулярами и осветительной системой (конденсор и электроосветитель или зеркало). Объективы ввинчиваются в револьверное устройство, окуляры устанавливаются в тубус. Объектив обеспечивает полезное увеличение – такое увеличение объекта, при котором можно выявить новые детали его строения. Окуляр обеспечивает бесполезное увеличение объекта – такое увеличение, при котором, увеличивая объект в сотни и более раз, нельзя обнаружить новых деталей строения. Для определения общего увеличения микроскопа следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра.

Для изучения гистологических препаратов используются прямые световые микроскопы. В прямых микроскопах источник света находится под образцом, а объектив и окуляр расположены над ним.

В инвертированных микроскопах образец находится над объективом. Инвертированный микроскоп позволяет изучать живые клетки в культуральных сосудах.

Сканирующие микроскопы для лабораторных исследований являются системой сканирования гистологического препарата и архивирования полученных изображений.

Также общелабораторным оборудованием морфологической лаборатории являются весы, автоматические пипетки, рН-метр, водяная баня, центрифуга, шейкер, автоклав, криокамера, холодильник, термостат, аквадистиллятор, вытяжной шкаф и др.

1.4. Вредные факторы при работе в морфологической лаборатории

В морфологической лаборатории используются спирты, кислоты, легковоспламеняющиеся вещества и летучие токсичные соединения. При работе с различными химическими реагентами должны соблюдаться соответствующие требования безопасности. Меры предо-

сторожности необходимо применять при работе со спиртовками и расплавленным парафином. Нужно быть предельно осторожным, работая с режущими предметами, в частности, с микротомными лезвиями. Все процедуры с биологическим материалом выполняются с использованием средств индивидуальной защиты.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. Изучить инструкции по правилам охраны труда при работе в гистологической лаборатории. Зафиксировать основные положения в отчете.
2. Ознакомиться с оборудованием учебной гистологической лаборатории. Внести в отчет сведения об оборудовании учебной гистологической лаборатории, с указанием фирмы и страны-производителя.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. Вас попросили организовать гистологическую лабораторию.
 1. *Каким оборудованием обязательно необходимо оснастить создаваемую лабораторию?*
 2. *Обоснуйте необходимость приобретения данного оборудования.*
2. Работа в морфологической лаборатории сопряжена с определенными вредными факторами.
 1. *Перечислите вредности, с которыми можно встретиться при работе в морфологической лаборатории.*
 2. *Как минимизировать воздействие вредных факторов на работников морфологической лаборатории?*

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ОБЩЕЛАБОРАТОРНЫМ ОБОРУДОВАНИЕМ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ЯВЛЯЕТСЯ
 - а) рН-метр

- б) весы
- в) термостат
- г) микротом

2. ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ –

- а) микротом
- б) инвертированный микроскоп
- в) ламинарный шкаф
- г) CO₂-инкубатор

3. МАНИПУЛЯЦИИ С ЛЕТУЧИМИ ТОКСИЧЕСКИМИ ЖИДКОСТЯМИ НЕОБХОДИМО ПРОВОДИТЬ В

- а) вытяжном шкафу
- б) криостате
- в) сухожарочном шкафу
- г) ламинарном шкафу

4. ЕСЛИ НЕОБХОДИМО СОБЛЮСТИ СТЕРИЛЬНОСТЬ, ТО МАНИПУЛЯЦИИ С ОБЪЕКТОМ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ В

- а) вытяжном шкафу
- б) криостате
- в) сухожарочном шкафу
- г) ламинарном шкафу

5. МИКРОТОМИЯ ЯВЛЯЕТСЯ ЭТАПОМ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- а) гистоэнзимологического
- б) гистологического
- в) иммуногистохимического
- г) цитологического

6. ЭТАПЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, КОТОРЫЕ МОЖНО АВТОМАТИЗИРОВАТЬ –

- а) вырезка материала и упаковка в кассеты для проводки
- б) заливка материала в парафиновые блоки
- в) микротомия
- г) окрашивание

7. **ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК –**
- а) ламинарный шкаф
 - б) СО₂-инкубатор
 - в) микротом
 - г) микроскоп
8. **УВЕЛИЧЕНИЕ МИКРОСКОПА С ОКУЛЯРОМ (×10) И ОБЪЕКТИВОМ (×40) РАВНО**
- а) 10
 - б) 50
 - в) 400
 - г) 4000
9. **ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СРЕЗОВ ЗАМОРОЖЕННЫХ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ИСПОЛЬЗУЕТСЯ**
- а) поляризационный микроскоп
 - б) микротом
 - в) криостат
 - г) термостат
10. **ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗОВ ПРИМЕНИМ**
- а) поляризационный микроскоп
 - б) микротом
 - в) криостат
 - г) ультратом

ТЕМА 2

ЗНАКОМСТВО С МЕТОДИКОЙ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

*Ну, что это такое Присыпкин?
На что Присыпкин? Куда Присыпкин? Кому Присыпкин?*
В. Маяковский. Клоп

- 1.1. Цель гистологического исследования.
- 1.2. Основные этапы приготовления гистологических препаратов.

2.1. Цель гистологического исследования

Гистологическое исследование повсеместно используется как в клинической диагностике, так и в фундаментальных исследованиях. Гистологическое исследование позволяет на основании особенностей строения тканей и клеток получить представление об их функционировании.

Морфологическое исследование биологического материала является одним из основных способов корректной постановки диагноза и широко используется в клинической практике.

2.2. Основные этапы приготовления гистологических препаратов

Основные этапы приготовления гистологических препаратов обобщены в таблице 1.

Таблица 1

Этап приготовления гистологических препаратов	Смысл процедуры
Взятие биологического материала	Определение и взятие фрагмента органа, микроскопическое исследование которого представляет интерес, информативно; маркировка материала

Фиксация биологического материала	Сохранение структуры биологического материала, близкой к прижизненной; предотвращение распада тканей
Промывка биологического материала	Отмывка образцов от фиксатора
Проводка биологического материала	Обезвоживание образцов для последующей заливки в парафин
Пропитка биологического материала парафином	Уплотнение образцов парафином, что облегчает их дальнейшую резку
Формирование парафинового блока	Придание парафиновому блоку оптимальной формы, что облегчает резку биологического материала (микротомию)
Приготовление гистологических срезов	Изготовление с парафиновых блоков срезов и перенос их на предметное стекло
Окраска гистологических срезов	Визуализация структуры ткани (неокрашенные срезы прозрачны)
Заключение окрашенных гистологических срезов	Сохранение окрашенного гистологического среза для длительного использования или хранения

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. Приготовить хромовую смесь.

Дистиллированная вода	100 мл
Бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$)	6 г
Серная кислота (уд. вес 1,84)	100 мл

Бихромат калия растворяют в воде, после чего в раствор медленно приливают серную кислоту. Хромовая смесь имеет темно-оранжевый цвет. При изменении цвета хромовой смеси на темно-зеленый она теряет свои свойства. Так как хромовая смесь содержит концентрированную серную кислоту, при работе с ней требуется соблюдать предельную осторожность.

2. Обработать в хромовой смеси стеклянную посуду, необходимую для приготовления основных растворов для пробоподготовки биологического материала к гистологическому исследованию. Хромовой смесью не следует мыть посуду, загрязненную парафином, ксилолом.
3. Внести в отчет сведения о проделанной работе.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. Известно, что при хирургическом лечении новообразований удаляют не только первичный опухолевый очаг, но и регионарные лимфатические узлы.

С какой целью на гистологический анализ будет направлена (1) опухоль и (2) регионарные лимфатические узлы?

2. Известно, что у спортсменов на международных соревнованиях берут фрагмент буккального эпителия для цитологического анализа.

С какой целью проводят данную процедуру?

3. Соискатель в рамках диссертационного исследования планирует оценить эффективность нового лекарственного препарата на опухолевый рост в эксперименте.

Является ли целесообразным для оценки эффективности и выявления побочного действия препарата проведение гистологического исследования органов экспериментальных животных? Обоснуйте ответ.

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ПРОЦЕДУРА, ПОЗВОЛЯЮЩАЯ ПРЕДОТВРАТИТЬ РАЗВИТИЕ ПОСМЕРТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОБРАЗЦЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА –
 - а) фиксация
 - б) микротомия
 - в) демаскировка
 - г) окрашивание

2. **МАРКИРОВКА ОБРАЗЦОВ ПРОВОДИТСЯ НА ЭТАПЕ**
 - а) фиксации биологического материала
 - б) проводки биологического материала
 - в) окраски гистологических срезов
 - г) заключения гистологических срезов

3. **ПРОЦЕДУРА, КОТОРУЮ НЕОБХОДИМО ПРОВЕСТИ ПОСЛЕ ОТМЫВКИ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ ФОРМАЛИНА ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ЗАЛИВКИ В ПАРАФИН**
 - а) обезвоживание биологического материала
 - б) депарафинизация гистологических срезов
 - в) окрашивание гистологических срезов
 - г) маркировка биологического материала

4. **ЗАЛИВКА В ПАРАФИН ФРАГМЕНТОВ ОРГАНОВ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ УПЛОТНЕНИЯ ОБРАЗЦА И НЕОБХОДИМА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ СЛЕДУЮЩЕЙ ПРОЦЕДУРЫ**
 - а) вырезка и ориентация биологического материала
 - б) микротомия биологического материала
 - в) окрашивание гистологических срезов
 - г) заключение гистологических срезов

5. **ЭТАП, НЕОБХОДИМЫЙ ДЛЯ ОКРАШИВАНИЯ ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗОВ ВОДНЫМИ РАСТВОРАМИ КРАСИТЕЛЕЙ, –**
 - а) пропитывание биологического материала
 - б) заливка биологического материала
 - в) депарафинизация гистологических срезов
 - г) заключение гистологических срезов

6. **ПРИ ПРОБОПОДГОТОВКЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НЕ НУЖНА ПРОЦЕДУРА**
 - а) микротомия биологического материала
 - б) депарафинизация гистологических срезов
 - в) окрашивание гистологических срезов
 - г) заключение гистологических срезов

7. ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СТРУКТУР БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ПРОВОДЯТ ПРОЦЕДУРУ
- а) промывка гистологических срезов
 - б) заключение гистологических срезов
 - в) окрашивание гистологических срезов
 - г) формирование парафиновых блоков
8. АРТЕФАКТЫ МОГУТ ПОЯВИТЬСЯ НА ЭТАПЕ
- а) фиксации биологического материала
 - б) маркировки биологического материала
 - в) обезвоживания биологического материала
 - г) окраски гистологических срезов
9. ВЕРНЫМ ПОРЯДКОМ ПРОЦЕДУР ПРИ ПРОБОПОДГОТОВКЕ К ГИСТОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ЯВЛЯЮТСЯ
- а) депарафинизация-окрашивание-вырезка-заключение
 - б) фиксация-проводка-микротомия-окрашивание
 - в) заключение-фиксация-окрашивание-промывка
 - г) заключение-окрашивание-вырезка-формирование парафиновых блоков
10. ОСНОВНЫМИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ КРАСИТЕЛЯМИ ЯВЛЯЮТСЯ
- а) гематоксилин и эозин
 - б) уранил ацетат и цитрат свинца
 - в) китайская тушь и индигокармин
 - г) орто-ксилол и 2,4,6-тринитрофенол

ТЕМА 3

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА К ГИСТОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ

*Как и всегда на Руси, к назначенному сроку
ничего готово не было....*

В. Пикуль. Фаворит

- 3.1. Приготовление растворов и реактивов для фиксации, проводки и заливки образцов биологического материала.
- 3.2. Приготовление растворов и расходных материалов для окраски и заключения гистологических срезов.

3.1. Приготовление растворов и реактивов для фиксации, проводки и заливки образцов биологического материала

Основные растворы для пробоподготовки биологического материала необходимо готовить заблаговременно.

Все растворы для пробоподготовки биологического материала необходимо заменять, когда их потребительские свойства теряются. Использование загрязненных или разбавленных реагентов приводит к плохому качеству гистологических препаратов.

Наиболее часто в качестве фиксатора биологического материала используют формалин. Формалин должен иметь характерный резкий запах, быть прозрачным. Для приготовления 10% нейтрального водного раствора формалина (4% нейтрального водного раствора формальдегида) к 1 части 40% нейтрального формалина добавляют 9 частей дистиллированной воды.

Для проводки биологического материала рекомендуется использовать изопропиловый спирт концентрацией не менее 99,5%. Проводку биологического материала осуществляют путем последовательного переноса образцов через несколько емкостей с изопропиловым

спиртом, совокупность которых называется батареей спиртов. Спирты для проводки должны быть прозрачными и иметь характерный запах. При помутнении или появлении осадка спирт необходимо заменить. Сильнее всего загрязняется первый спирт в батарее, поэтому его следует часто заменять. Первый спирт сливают, оставшиеся спиртовые емкости в батарее смещают на одну позицию. Последний спирт в батарее заменяют на новый. Максимальная чистота последнего спирта в батарее спиртов является важным условием полной дегидратации образцов биологического материала.

Парафин, используемый для пропитки и заливки образцов, должен быть гомогенным, пластичным и иметь определенную температуру плавления. В гистологической лаборатории используется легкоплавкий (температура плавления 54–56 °С) и тугоплавкий (температура плавления 56–58 °С) парафины. Полное расплавление парафина (парафиновой смеси) занимает несколько часов, поэтому вносить в термостат парафин необходимо заблаговременно.

Хранение и манипуляции со спиртовой горелкой (спиртовкой) необходимо проводить вдали от легковоспламеняющихся материалов и открытого пламени. Комплектность спиртовки: резервуар, фитиль с фитильной трубкой, крышка. Крышка используется для тушения пламени спиртовки, использовать спиртовку без крышки категорически запрещено. Резервуар спиртовки заполняется этиловым спиртом не более, чем на половину. Недопустимо оставлять горящие спиртовки без присмотра.

3.2. Приготовление растворов и расходных материалов для окраски и заключения гистологических срезов

Для расплавления гистологических срезов и при их окраске необходимо использовать дистиллированную воду. Перед началом работы необходимо удостовериться в наличии достаточного количества дистиллированной воды в лаборатории.

Для гистологического исследования применяются предметные стекла, не требующие дополнительной обработки. Для определенных

целей, например, для иммуногистохимического исследования, рекомендуется использовать предметные стекла с дополнительным адгезивным покрытием.

Цитологические мазки также можно делать на предметных стеклах без дополнительной обработки. Однако, для стандартизации цитологического исследования и повышения качества цитологических препаратов рекомендуется обеспечивать максимальную смачиваемость предметных стекол, обезжирив их. Смачиваемость стекол позволит клеткам наилучшим образом распластываться и прилипать к стеклу, что облегчит изучение их структуры. Стоит отметить, что размер клеток на цитологическом препарате может сильно варьировать в зависимости от степени их распластывания на предметном стекле.

Ксилол для депарафинизации и просветления необходимо использовать чистотой не ниже ЧДА. Ксилол должен быть прозрачным, иметь характерный запах. Если ксилол не обеспечивает достаточной депарафинизации, значит он загрязнен парафином и его необходимо заменить.

На сегодняшний день в гистологической лаборатории используют стандартизированные коммерческие красители и среды для заключения. При необходимости красители и среду для заключения можно приготовить самостоятельно в соответствии с протоколами. Многие красители необходимо готовить заблаговременно; некоторые красители нужно готовить *ex tempore*. Точное следование протоколам приготовления красителей является залогом успешного результата.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. Приготовить емкости с формалином для фиксации материала. В чистые герметично закрывающиеся емкости объемом 100 мл налить по 80 мл 10% нейтрального водного раствора формалина.
2. Приготовить парафин для пропитывания и заливки образцов. Парафиновую смесь поместить в термостат (56 °С) в промаркированных емкостях (стеклянные или пластиковые стаканы объемом 250–500 мл).

3. Подготовить спиртовку к работе. Залить в резервуар спиртовки этиловый спирт не более, чем на половину.
4. Приготовить батарею спиртов для проводки (обезвоживания) биологического материала. Пронумеровать 8 чистых герметично закрывающихся емкостей объемом 100 мл. В емкости налить по 80 мл концентрированного изопропилового спирта.
5. Приготовить емкость с о-ксилолом (ЧДА) для депарафинизации. Промаркировать чистую герметично закрывающуюся емкость объемом 250–300 мл. В емкость налить о-ксилол из расчета, что раствор при погружении в него предметных стекол должен полностью покрывать гистологические срезы.
6. Приготовить батарею спиртов для отмывки срезов от о-ксилола. Пронумеровать 3 чистые герметично закрывающиеся емкости объемом 100 мл. В емкости налить по 80 мл концентрированного этилового спирта.
7. Приготовить растворы красителей: гематоксилина и эозина. Промаркировать емкости для красителей. Налить в емкости столько красителя, чтобы при погружении в него предметных стекол раствор полностью покрывал срезы.
8. Приготовить солянокислый спирт для окрашивания. Промаркировать емкость объемом 100 мл. К 100 мл 70° этилового спирта добавьте 5–6 капель концентрированной соляной кислоты. Чтобы приготовить 70° этиловый спирт, необходимо к 100 мл 95° этилового спирта добавить 33 мл дистиллированной воды.
9. Приготовить батарею спиртов для отмывки гистологических срезов от эозина. Пронумеровать 3 чистые герметично закрывающиеся емкости объемом 100 мл. В емкости налить по 80 мл концентрированного этилового спирта.
10. Приготовить емкость с о-ксилолом (ЧДА) для просветления. Промаркировать чистую герметично закрывающуюся емкость объемом 250–300 мл, в которую налить о-ксилол из расчета, что жидкость при погружении в него предметных стекол должна полностью покрывать срезы.

11. Приготовить монтирующую среду (канадский бальзам) для заключения окрашенных гистологических срезов. Кусочки смолы канадской ели поместить в сосуд с герметично закрывающейся крышкой, залить столько растворителя (о-ксилол), чтобы он покрыл смолу, и оставить до полного растворения в термостате (37 °С). Консистенция готового канадского бальзама должна напоминать консистенцию жидкого меда. Если канадский бальзам слишком вязкий, необходимо добавить растворителя (о-ксилол). Если бальзам слишком жидкий, необходимо добавить смолы.

12. Приготовить предметные стекла для исследования крови и костного мозга. Для обезжиривания предметные стекла помещают в этиловый спирт 95° или в смесь Никифорова на 12–24 ч. Смесь Никифорова – это смесь в объемном соотношении 1:1 95° этилового спирта и диэтилового эфира. Каждое стекло насухо до скрипа протирают хлопчатобумажной тканью (например, медицинским бинтом). При манипуляции с предметными стеклами, допустимо касаться пальцами рук только их ребер.

13. Внести в отчет сведения о проделанной работе.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. Студент готовится к выведению животных из эксперимента и взятию биологического материала.

Какие растворы должен приготовить студент перед началом работы?

2. Студент готовится к заливке биологического материала в парафин.

Какие растворы должен приготовить студент перед началом работы?

3. Студент готовится к окраске гистологических срезов.

Какие растворы должен приготовить студент перед началом работы?

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. В КАЧЕСТВЕ ФИКСАТОРА ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ
 - а) формалин
 - б) спирт этиловый
 - в) вода дистиллированная
 - г) парафин

2. рН ФОРМАЛИН ОПТИМАЛЬНЫЙ ДЛЯ ФИКСАЦИИ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
 - а) 1,5–2,0
 - б) 4,5–5,0
 - в) 7,0–7,5
 - г) 8,0–8,5

3. КОНЦЕНТРАЦИЯ РАСТВОРА ФОРМАЛЬДЕГИДА, ПРИМЕНЯЕМАЯ ДЛЯ ФИКСАЦИИ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА –
 - а) 10%
 - б) 4%
 - в) 50%
 - г) 100%

4. РЕЗЕРВУАР СПИРТОВКИ СЛЕДУЕТ ЗАПОЛНЯТЬ ЭТИЛОВЫМ СПИРТОМ
 - а) не более, чем наполовину
 - б) более, чем наполовину
 - в) не менее, чем наполовину
 - г) этиловый спирт не применяется в качестве топлива спиртовки

5. ДЛЯ ПРОВОДКИ (ОБЕЗВОЖИВАНИЯ) ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ИСПОЛЬЗУЮТ
 - а) формалин
 - б) парафин

- в) спирт (этиловый, изопропиловый)
- г) ацетон

6. УПЛОТНИТЕЛИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ –

- а) формалин
- б) парафин
- в) ксилол
- г) гематоксилин и эозин

7. РАСПЛАВЛЕНИЕ ПАРАФИНА ДЛЯ ЗАЛИВКИ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ

- а) +30 °С – +35 °С
- б) +4 °С – +8 °С
- в) +50 °С – +55 °С
- г) -20 °С

8. ДЛЯ ДЕПАРАФИНИЗАЦИИ ПРИМЕНИМЫ

- а) дистиллированная вода
- б) водопроводная вода
- в) ксилол
- г) канадский бальзам

9. СРЕДОЙ ДЛЯ ЗАКЛЮЧЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- а) парафин
- б) формалин
- в) ксилол
- г) канадский бальзам

10. ТОКСИЧНЫМИ ЖИДКОСТЯМИ, С КОТОРЫМИ НЕОБХОДИМО РАБОТАТЬ В СРЕДСТВАХ ЗАЩИТЫ И В УСЛОВИЯХ ВЫТЯЖНОГО ШКАФА, ЯВЛЯЮТСЯ

- а) формалин
- б) этанол
- в) ксилол
- г) парафин

ТЕМА 4

ВЗЯТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ЕГО ФИКСАЦИЯ

*Так ярый ток, оледенев,
Над бездною висит,
Утратив прежний грозный рёв,
Храня движенья вид.*

Е. Баратынский. Надпись

- 4.1. Выведение лабораторных животных из эксперимента.
- 4.2. Особенности взятия органов для гистологического исследования.
- 4.3. Подбор фиксирующей жидкости.

4.1. Выведение лабораторных животных из эксперимента

Материалом для гистологического исследования могут быть фрагменты органов человека (биоптаты и аутоптаты) или лабораторных животных. В учебных и научных целях для изготовления гистологических препаратов чаще всего используются фрагменты органов лабораторных животных. Взятие биологического материала проводят сразу же после умерщвления животного.

В основе любых экспериментов с использованием животных должны лежать принципы гуманности. Эксперименты с участием животных необходимо проводить с соблюдением Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.08.1987 г.) и Федерального Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» (от 01.01.1997 г.), а также требованиями Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Метод умерщвления лабораторного животного является гуманным, если: является безболезненным; не вызывает беспокойства у животного; надежно вызывает быструю потерю сознания

и смерть; соответствует возрасту, виду и состоянию здоровья животного. Метод умерщвления должен быть легким в исполнении, вызывать минимальные морфофункциональные изменения органов, а также являться безопасным для исследователя и других животных, находящихся в виварии.

Методы умерщвления можно разделить на физические методы (оглушение, декапитация и цервикальная дислокация) и химические методы (ингаляционный, инъекционный наркоз). Часто физические и химические методы умерщвления лабораторных животных сочетают друг с другом.

Асфиксия углекислым газом (CO_2), после которой выполняют цервикальную дислокацию или вскрытие грудной полости, является предпочтительным методом умерщвления мелких лабораторных животных. Сжатый углекислый газ хранят в лаборатории в баллонах, для умерщвления используют 90–100% CO_2 . Животных помещают в герметичные камеры, заполненные CO_2 , на 5–10 мин. Изначально углекислый газ вызывает анестезию и бессознательное состояние животных. Необходимо убедиться в отсутствии дыхания и сердцебиения, чтобы констатировать смерть животного. Для дополнительной уверенности, животным проводят декапитацию, цервикальную дислокацию или вскрытие грудной полости. Новорожденные животные более устойчивы к гипоксическим условиям, для их умерщвления необходимо увеличить время экспозиции в камерах, заполненных CO_2 , до 15 мин. Не рекомендуется использовать углекислый газ для умерщвления амфибий и рептилий.

Инъекция барбитуратов также является распространенным методом умерщвления лабораторных животных. Доза, при которой барбитураты угнетают активность центрального отдела нервной системы, обладают обезболивающим эффектом, вызывают нарушение дыхания и остановку сердца, как минимум в два раза превышает необходимую для анестезии дозировку. Грызунам инъекцию барбитуратов проводят внутривентрально, крупным животным – внутривенно.

Умерщвление ингаляционными анестетиками (галлотан, энфлуран, изофлуран) является приемлемым для мелких лабораторных жи-

вотных и некоторых крупных млекопитающих. Так же, как при асфиксии углекислым газом, смерть, вызванную передозировкой ингаляционным наркозом, нужно верифицировать (проверить наличие дыхания, сердцебиения), для уверенности провести декапитацию, цервикальную дислокацию или вскрытие грудной полости наркотизированных животных. Использование для умерщвления диэтилового эфира и хлороформа в качестве ингаляционных анестетиков нежелательно, так как они оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки, а также повышают концентрацию глюкозы в плазме крови животного. Помимо этого, диэтиловый эфир является легковоспламеняющимся веществом. Стоит отметить необходимость ограничить воздействие ингаляционных анестетиков на персонал.

Цервикальная дислокация применима для мышей и крыс весом менее 200 г. Цервикальную дислокацию проводят седатированным (наркотизированным) животным. Стоит отметить, что исследователь должен выполнять цервикальную дислокацию профессионально, чтобы не подвергать животное страданиям.

Декапитация с помощью гильотины также используется для умерщвления седатированных мелких лабораторных животных. Лезвие гильотины необходимо регулярно затачивать, чтобы не подвергать животное страданиям. Гильотину следует тщательно мыть после каждой процедуры, так как некоторые животные могут негативно реагировать на запах крови.

Тушки лабораторных животных, использованные шприцы, иглы и подстилочный материал относятся к биологически опасным отходам класса Б. Правила их сбора и утилизации регламентированы Санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 22 января 1999 г. № 2. Трупы лабораторных животных в герметичных пакетах необходимо поместить в предназначенный для этого морозильник.

Небольших животных (мышей, крыс) перед вскрытием фиксируют к специальной платформе лигатурами или иглами. Кожу на жи-

воте оттягивают хирургическим пинцетом и ножницами вырезают лоскут кожи вдоль средней линии от нижней части живота до шеи. Тупым методом отделяют кожу от подлежащих тканей, зажимами оттягивают кожу в стороны. Переднюю стенку живота по средней линии оттягивают хирургическим пинцетом и прорезают ножницами. Ножницами делают разрезы по обе стороны от грудины, грудину с реберными хрящами удаляют. Расширение разрезов зажимами дает широкий доступ к органам грудной и брюшной полостей.

4.2. Особенности взятия органов для гистологического исследования

При взятии образца биологического материала необходимо минимизировать механическое воздействие на него: использовать острые режущие инструменты, не допускать сдавливание образца пинцетом.

Размер образца биологического материала не должен превышать размеры 15×10×4 мм. Вырезая фрагмент органа необходимо учитывать особенности его строения и цели исследования. В случае необходимости исследования патологически измененного органа, биологический материал забирают таким образом, чтобы в образце находились как нативные, так и патологически измененные участки тканей.

Образец биологического материала сразу должен быть промаркирован. Стоит отметить, что разработка системы маркировки образцов должна быть проведена заблаговременно. Откладывание маркировки образца может привести к утрате информации или ошибкам в идентификации образца биологического материала.

Сразу после взятия необходимо начать фиксацию образца биологического материала. Перед фиксацией, при необходимости, органы взвешивают на лабораторных весах, не допуская пересыхания органов.

Если строение органа однородно, то может быть взят любой его фрагмент. Имеет значение, какой фрагмент органа предпочтительнее брать, если орган имеет зональное строение (например, корковое и

мозговое вещество). Стенку полых органов исследуют в поперечном сечении.

Если орган имеет плотную капсулу, то перед фиксацией рекомендуется ее надсечь.

Перед фиксацией образцы биологического материала ополаскивают в физиологическом растворе, чтобы (1) отмыть образец от крови, желчи, слизи и др. (2) добиться расслабления гладких миоцитов.

Легкие при вскрытии грудной полости спадаются, поэтому иногда прибегают к умеренному раздуванию легких перед фиксацией.

Головной мозг фиксируют на вате, чтобы минимизировать его деформацию.

Артефактами взятия образца биологического материала является механическое повреждение биологического материала: деформация, разрывы, размозжение.

4.3. Подбор фиксирующей жидкости

Фиксация образца биологического материала предотвращает аутолиз и способствует стабилизации структур органа. Недостаточная фиксация образца ведет к появлению дефектов вплоть до полной потери биологическим материалом информативности и диагностической ценности.

Основными методами фиксации являются глубокое замораживание материала (криофиксация) и химическая фиксация. Для разных образцов и диагностических целей применимы различные методы фиксации. Например, для исследования жировой ткани не подходит формалиновая, спиртовая, ацетоновая фиксация. Для фрагментов органов толще 3–5 мм этиловый спирт и ацетон в качестве фиксатора также не подходят.

Все фиксаторы делятся на простые (однокомпонентные) и сложные (составные). Примерами простых фиксаторов являются формалин, этиловый спирт, ацетон. Примерами сложных фиксаторов являются Ценкер-формол (смесь растворов бихромата калия, сульфат натрия, сулемы и формалина), жидкость Буэна (смесь растворов пик-

риновой кислоты, формалина и ледяной уксусной кислоты), жидкость Карнуа (смесь этанола, хлороформа и ледяной уксусной кислоты).

Наиболее распространенным фиксатором является 10% забуференный (рН=7,4) формалин (4% водный раствор формальдегида). Стоит отметить, что увеличение концентрации формалина не способствует улучшению фиксации. Напротив, при использовании в качестве фиксирующей жидкости более концентрированного раствора формалина поверхностные участки биологического образца чрезмерно уплотняются, препятствуя проникновению фиксатора глубже. Скорость фиксации формалином составляет до 0,8 мм/час, для образца стандартного размера рекомендуется фиксация не менее 8–12 ч. Плотные образцы рекомендуется фиксировать дольше. Объемное соотношение формалина и ткани должно составлять 20 : 1. Если фиксирующая жидкость после помещения в нее биологического материала изменила цвет, то фиксатор необходимо заменить. Повторно фиксатор не используется.

В формалине биологический материал может храниться длительное время. Для иммуногистохимического исследования биологический материал рекомендуется фиксировать не более 12–24 ч!

Для ускорения фиксации или для фиксации образца крупного размера используется перфузия биологического материала фиксатором.

Наиболее серьезным артефактом фиксации может быть аутолиз биологического материала. При длительной фиксации в формалине в материале могут появляться бурые гранулы.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. Сделать мазок крови лабораторного животного.
2. Под контролем преподавателя вывести лабораторное животное (крысу) из эксперимента. Провести взятие, маркировку и фиксацию фрагментов органов: легкое, аорта, печень, селезенка, почка, головной мозг.
3. Сделать мазок костного мозга лабораторного животного.

4. Внести в отчет сведения о проделанной работе.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. Во время операции появилась необходимость взять фрагмент органа для гистологического исследования. Формалина в операционной не оказалось.

Можно ли фрагмент органа, предназначенный для гистологического анализа, поместить в (1) абсолютный этиловый спирт, (2) физиологический раствор или (3) дистиллированную воду? Обоснуйте ответ.

2. Аспирант в эксперименте на крысах изучает влияние лекарственного препарата на строение легких. Аспирант взял небольшой фрагмент органа (1 см³ ткани) и поместил в 1 мл фиксатора (10% формалин).

Какую ошибку допустил аспирант на этапе фиксации образца?

3. Исследователь в эксперименте на овцах изучает влияние лекарственного препарата на строение почки. Исследователь поместил целую почку животного в 500 мл фиксатора.

Какие ошибки допустил исследователь на этапе фиксации образца?

4. В лабораторию поступили фиксированные в формалине интраоперационные биопсии во флаконах, лишенных маркировки.

На каком этапе необходимо маркировать образцы?

5. В крупном объемном гистологическом образце, например, целом сердце человека, необходимо предотвратить посмертные изменения.

Предложите метод фиксации для предотвращения посмертных изменений.

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ДЛЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОПТИМАЛЬНОЕ ВРЕМЯ ФИКСАЦИИ В ФОРМАЛИНЕ
 - а) 1 ч
 - б) 12–24 ч
 - в) до 6 мес.
 - г) до 12 мес.

2. РАЗМЕР БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗЦА, ВЗЯТЫЙ ДЛЯ ФИКСАЦИИ В ФОРМАЛИНЕ, НЕ ДОЛЖЕН ПРЕВЫШАТЬ ПАРАМЕТРЫ
 - а) 15×10×4 мм
 - б) 2×2×2 мм
 - в) 15×15×15 мм
 - г) 40×20×10 мм

3. СЛОЖНЫМИ ФИКСАТОРАМИ ЯВЛЯЮТСЯ
 - а) формалин
 - б) этанол
 - в) жидкость Буэна
 - г) жидкость Карнуа

4. ФОРМАЛИН ВХОДИТ В
 - а) жидкость Буэна
 - б) Ценкер-формол
 - в) сулема
 - г) жидкость Карнуа

5. ПРИ ВЗЯТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ФИКСАЦИИ БЕРУТ
 - а) только патологически измененный материал
 - б) только нормальный материал
 - в) материал на границе патологического и нормального материала

6. ВО ИЗБЕЖАНИЕ НЕЖЕЛАТЕЛЬНОГО РАЗМОЗЖЕНИЯ ТКАНЕЙ
 - а) фиксируют крупные фрагменты органов, а вырезку материала проводят после фиксации

- б) работают только острыми инструментами
- в) не кормят животное 12–24 ч до выведения из эксперимента
- г) промывают органы перед фиксацией теплым физиологическим раствором

7. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ПОМЕЩАЮТ В ФИКСАТОР

- а) сразу после взятия
- б) через 1–2 мин после взятия
- в) через 30 мин после взятия
- г) через 24 ч после взятия

8. ОБЪЕМ ФИКСАТОРА ДОЛЖЕН

- а) быть равным объему фиксируемого материала
- б) быть таким, чтобы полностью покрывать фиксируемый материал
- в) превышать объем фиксируемого материала в 2 раза
- г) превышать объем фиксируемого материала в 20–40 раз

9. ЕСЛИ ФИКСАТОР ИЗМЕНИЛ ЦВЕТ, ПОСЛЕ ПОМЕЩЕНИЯ В НЕГО ОБРАЗЦОВ ОРГАНОВ, СЛЕДУЕТ

- а) исключить данные образцы как непригодные для гистологического анализа
- б) профильтровать фиксатор
- в) заменить фиксатор свежим
- г) увеличить время фиксации

10. АРТЕФАКТ, ВОЗНИКАЮЩИЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ ОБРАЗЦОВ В ФОРМАЛИНЕ

- а) появление темно-коричневых гранул
- б) появление эозинофильных гранул
- в) разрушение ядер клеток
- г) метахромазия ядер клеток

ТЕМА 5

ПРОМЫВКА, ВЫРЕЗКА И ПРОВОДКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

*Каждый день – этап,
к цели намеченной шаг.*
В. Маяковский. Служака

- 5.1. Вырезка фрагментов биологического материала.
- 5.2. Промывка фрагментов биологического материала.
- 5.3. Проводка фрагментов биологического материала.

5.1. Вырезка фрагментов биологического материала

После фиксации проводят окончательное формирование фрагмента биологического материала. В результате фиксации образцы становятся плотнее, в связи с чем намного проще манипулировать не со свежими, а с фиксированными фрагментами органов. Формирование фрагмента биологического материала подразумевает вырезание фрагмента нужной формы и размера, отсечение ненужных участков (например, жировая ткань вокруг органа), подравнивание краев образца. При вырезке следует помнить, что чем больше площадь фрагмента биологического материала, тем сложнее получить тонкий срез. Вырезку каждого образца нужно производить на чистой поверхности и чистыми инструментами, чтобы исключить его загрязнение фрагментами тканей другого образца. Для удобства последующих манипуляций после формирования фрагменты биологического материала упаковывают в промаркированные гистологические кассеты или, в случае их отсутствия, в марлевые мешочки вместе с маркировкой. Таким образом, каждый фрагмент биологического материала маркирован и имеет индивидуальную упаковку.

5.2. Промывка фрагментов биологического материала

После фиксации в формалине биологический материал необходимо отмыть от фиксатора в проточной воде в течение 3–24 ч. Для этого на водопроводный кран надевают резиновую трубку, конец которой опускают в широкогорлую емкость, закрытую марлей. Загрязнение образца формалином влияет на качество микротомии. При использовании в качестве фиксаторов этилового спирта или ацетона, а также при фиксации замораживанием промывка биологического материала не требуется.

5.3. Проводка фрагментов биологического материала

Проводка биологического материала – это подготовка биологического материала к заливке в уплотняющую среду (парафин, целлоидин, эпоксидные смолы и др.). Чаще всего биологический материал для гистологического исследования заливают в парафин (парафиновую смесь). Парафин не смешивается с водой, поэтому проводка биологического материала заключается в дегидратации (обезвоживании) биологического материала и пропитывании его парафином.

Постепенное обезвоживание достигается проводкой образца через батарею спиртов (этилового или изопропилового) восходящей концентрации или чистоты. Применение для проводки изопропилового спирта считается предпочтительным, так как он меньше деформирует образцы, а также, в отличие от этилового спирта, смешивается с парафином. Необходимо следить за чистотой спиртов в батарее для обеспечения полного обезвоживания образца.

После проведения через батарею спиртов, биологический материал проводят через несколько смен парафина, который является наиболее распространенным уплотнителем в гистологических исследованиях. Во время проведения биологического материала через смены парафинов, осуществляется пропитывание парафином и уплотнение образцов. В качестве промежуточной среды между батареями

спиртов и сменами парафина может быть использовано вазелиновое масло.

В ходе проводки могут возникать артефакты. Неполная отмывка биологического материала от формалина приводит к недостаточной дегидратации, что препятствует качественному пропитыванию и заливке в парафин.

Высушивание образцов в процессе проводки недопустимо, так как может привести к дополнительному растрескиванию и деформации биологического материала.

Обезвоживание приводит к уменьшению и деформации структур, а также влияет на их объемное соотношение. Неполное обезвоживание является препятствием к пропитыванию и заливке в парафин. Значительное увеличение времени обезвоживания может привести к чрезмерному уплотнению («высушиванию») и осложнению микротомии биологического материала.

Проводка образцов биологического материала может привести к вымыванию растворимых в воде и в изопропиловом спирте веществ, что необходимо помнить при планировании гистохимического исследования.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. Провести вырезку, промывку и обезвоживание биологического материала. Промывать промаркированные вырезанные фрагменты фиксированного биологического материала в проточной воде 3 ч. После промывки дегидратировать образцы в изопропиловом спирте восходящей чистоты.

Этап проводки	Продолжительность
Изопропиловый спирт №1	1 ч
Изопропиловый спирт №2	2 ч
Изопропиловый спирт №3	3 ч
Изопропиловый спирт №4	4 ч
Изопропиловый спирт №4	5 ч
Изопропиловый спирт №5	5 ч
Изопропиловый спирт №6	5 ч

Изопропиловый спирт №7

5 ч

Вазелиновое масло

При необходимости можно оставить на несколько суток (необязательная стадия).

2. Внести в отчет сведения о проделанной работе.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. Лаборанту необходимо выполнить пробоподготовку биологического материала для гистологического исследования.

Нужно ли проводить промывку для (1) замороженных биологических образцов и (2) фиксированных в формалине биологических образцов?

2. На этапе взятия биологического материала исследователь не стал отсекал жировую капсулу органа, подравнивал края образца.

1. Почему вырезку биологического материала удобнее проводить после его фиксации в формалине, а не перед фиксацией?

2. Для чего проводят вырезку биологического материала?

3. В лабораторию в связи с модернизацией оборудования закупили гистологические кассеты.

Для каких этапов пробоподготовки биологического материала могут быть использованы гистологические кассеты?

4. Одним из этапов пробоподготовки биологического материала для гистологического исследования является промывка и последующее обезвоживание образцов.

Нужно ли перед приготовлением срезов обезвоживать (1) замороженные биологические образцы и (2) фиксированные в формалине биологические образцы?

5. Цель исследования: оценить перспективу использования экстракта *Горькуши спорной* для лечения остеомиелита.

Какой дополнительный этап пробоподготовки необходимо осуществить для приготовления гистологических препаратов костей?

6. Лаборант должным образом не следил за чистотой дегидратирующих растворов, что привело к неполному обезвоживанию биологических образцов.

Для чего перед заливкой образцов в парафин или эпоксидные смолы, биологический материал необходимо обезвоживать?

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ПРОВОДКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В
 - а) фиксации
 - б) обезвоживании
 - в) уплотнении
 - г) микротомии
2. ОБЕЗВОЖИВАНИЕ ОБРАЗЦОВ НЕ ПРОВОДЯТ ПРИ
 - а) фиксации в формалине
 - б) фиксации в жидкости Буэна
 - в) фиксации в Ценкер-формоле
 - г) криофиксации
3. ОБЕЗВОЖИВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ПРОВОДИТСЯ ПРИ ФИКСАЦИИ
 - а) в формалине
 - б) в жидкости Буэна
 - в) в 95% этаноле
 - г) в ацетоне
4. ДЛЯ ОБЕЗВОЖИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЮТ
 - а) растворы этанола возрастающей концентрации
 - б) растворы изопропанола возрастающей чистоты
 - в) растворы солей тяжелых металлов
 - г) растворы орто-ксилола возрастающей чистоты
5. ВЕРНАЯ СХЕМА ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
 - а) фиксация в формалине – промывка в воде – обезвоживание в спиртах – пропитывание в парафине

- б) промывка в воде – фиксация в формалине – обезвоживание в спиртах – пропитывание в парафине
- в) фиксация в формалине – обезвоживание в спиртах – пропитывание в парафине
- г) фиксация в формалине – обезвоживание в спиртах – промывка в воде – пропитывание в парафине

6. ПРОПИТЫВАНИЕ И ЗАЛИВКА ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ПАРАФИН НЕОБХОДИМА ДЛЯ

- а) коагуляции белков в образце (химическая фиксация)
- б) уплотнения образцов
- в) обезвоживания образцов
- г) декальцинации образцов

7. АРТЕФАКТЫ, ПОЯВЛЯЮЩИЕСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ОБЕЗВОЖИВАНИЯ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

- а) появление темно-коричневых гранул
- б) метахромазия ядер клеток
- в) уменьшение размеров структур
- г) набухание структур

8. ЧТОБЫ МИНИМИЗИРОВАТЬ СМОРЩИВАНИЕ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ХОДЕ ПРОВОДКИ В ЭТАНОЛЕ

- а) используют батарею спиртов, постепенно увеличивая их концентрацию
- б) сразу перемещают образцы в 95% этанол для уменьшения времени обезвоживания
- в) осуществляют процедуру при 56 °С
- г) не промывают образцы перед началом проводки

9. ВРЕМЯ ЭКСПОЗИЦИИ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В СПИРТАХ ЗАВИСИТ ОТ

- а) плотности ткани (характера образца)
- б) размера образца
- в) формы образца
- г) наличия ионов кальция в образце

10. ПРОПИТЫВАНИЕ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
В ПАРАФИНЕ ПРОВОДЯТ

- а) в нескольких сменах парафина
- б) в одной смене парафина
- в) при температуре +56 °С
- г) при температуре -4 °С

ТЕМА 6

ФОРМИРОВАНИЕ ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ

*Форме дай щедрую дань
Временем: важен в поэме
Стиль, отвечающий теме.
Стих, как монету, чекань
Строго, отчетливо, честно...*

Н. Некрасов. Подражание Шиллеру

- 6.1. Перенос образцов биологического материала в формы для заливки.
- 6.2. Заливка образцов биологического материала в парафин.
- 6.3. Изготовление гистологического блока.

6.1. Перенос образцов биологического материала в формы для заливки

Заливка – это процедура получения парафиновых блоков, используемых для микротомии образцов биологического материала. Залитые в парафин образцы биологического материала могут храниться годами. Предпочтительно использовать специализированную парафиновую среду для заливки, имеющую оптимальный состав.

Заливку образцов биологического материала проводят в специальных формах для заливки. Формы бывают различного размера, для заливки каждого образца выбирается наиболее соответствующая по размеру форма. Образцы биологического материала переносятся с помощью пинцета на дно предварительно подогретой (+54 – +57°C) формы для заливки.

Формы для заливки и образец должны соответствовать по размеру. Использование слишком маленькой для образца формы для заливки не рекомендуется для предотвращения его механического повреждения. При использовании слишком большой для образца формы

для заливки бесполезная площадь поверхности блока увеличивается, что осложняет микротомию.

6.2. Заливка образцов биологического материала в парафин

После пропитывания в нескольких сменах парафина, образцы переносят в чистый растопленный парафин (+54 – +57 °С). Фрагмент органа переносят на дно заливочной формы и ориентируют. Особые требования к ориентации выдвигаются при заливке образцов полых органов и сосудов, чтобы на гистологическом срезе были представлены все слои изучаемого объекта. Для ориентации образца в форме применяют препаровальную иглу. Все инструменты, используемые при заливке, должны быть подогреты до температуры парафина (+56°С).

Залитые формы оставляют остывать (+4 °С) до полного затвердевания парафина, после чего извлекают содержимое из формы.

Образование пустот, трещин парафина в результате заливки затрудняет микротомию. В этом случае необходимо повторно расплавить парафиновую смесь и повторить процедуру заливки.

Если объект залит таким образом, что для получения среза максимальной площади необходима существенная грубая подрезка перед микротомией, то объект рекомендуется перезалить.

Перегрев биологического материала в горячем парафине может быть причиной коагуляции белков, что усложняет микротомию и может приводить к неравномерному окрашиванию гистологического среза.

6.3. Изготовление парафинового блока

Если были использованы специализированные формы для заливки, то непосредственно после заливки и ориентации образца биологического материала, пока парафиновая смесь не остыла, форму сверху закрывают корпусом гистологической кассеты. В таком случае парафиновый блок уже сформирован.

Часто формирование парафинового блока происходит после заливки. Из затвердевшего парафина скальпелем, подогретым в пламени спиртовки, вырезают фрагменты, оставляя по сторонам от края образца биологического материала слой парафина шириной 1-2 мм. Парафиновому блоку придают форму усеченной пирамиды, с основанием в форме прямоугольника или трапеции. Основание парафинового блока подплавляют на шпателе в пламени спиртовки, после чего приклеивают на промаркированную деревянную или пластиковую колодку.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. Провести пропитывание образцов в трех сменах парафина. Осуществить заливку образцов в парафин.

Этап проводки	Продолжительность
Парафин №1 (56 °С) пропитывание	1,5 ч
Парафин №2 (56 °С) пропитывание	1 ч
Парафин №3 (56 °С) пропитывание и заливка	1 ч

2. Сформировать парафиновые блоки на основе залитых в парафиновую смесь образцов.

3. Приклеить парафиновые блоки на деревянные колодки.

4. Внести в отчет сведения о проделанной работе.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. На гистологическом препарате обнаружены очаги термического повреждения.

На каких этапах пробоподготовки биологического материала возможно его термическое повреждение?

2. После заливки образцов органов в парафин обнаружили следующие дефекты: (1) вокруг образца локализуется ореол (ободок), (2) в толще парафина имеются трещины.

Какая процедура позволит исправить данные дефекты?

3. Студент формировал парафиновые блоки и обратил внимание на большое количество «пустого» парафина на верхушке блока.

Как уменьшить количество «пустого» парафина (без биологического материала) на поверхности блока?

4. Известно, что чем больше площадь парафинового блока, тем сложнее сделать с него одинаковый по толщине тонкий срез.

Целесообразно ли использовать для заливки почки и мочеточника крысы заливочные формы одинакового размера?

5. Лаборант при заливке биологического материала в парафин не уделил должного внимания ориентации образца в форме для заливки.

Какое значение для гистологического исследования имеет ориентировка: (1) фрагмента печени, (2) фрагмента почки?

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ЗАЛИВКА В ПАРАФИН НЕОБХОДИМА ДЛЯ

- а) обезвоживания образца
- б) увеличения плотности образца для облегчения микротомии
- в) консервации и хранения образцов
- г) окрашивания образца

2. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ ЛЕГКОПЛАВКОЙ ФРАКЦИИ ПАРАФИНА

- а) 40–42 °С
- б) 54–56 °С
- в) 56–57 °С
- г) 60–62 °С

3. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ ТУГОПЛАВКОЙ ФРАКЦИИ ПАРАФИНА

- а) 40–42 °С
- б) 54–56 °С
- в) 56–58 °С
- г) 60–62 °С

4. ОБРАЗЕЦ, ЗАЛИТЫЙ В ПАРАФИН, ИЗВЛЕКАЮТ ИЗ ФОРМЫ ДЛЯ ЗАЛИВКИ
 - а) сразу после заливки
 - б) через 15 мин после заливки
 - в) через 1 ч после заливки
 - г) после полного затвердевания парафина

5. ПРИ ДЕФЕКТАХ ЗАЛИВКИ (НЕОДНОРОДНОСТЬ ЗАЛИВОЧНОЙ МАССЫ, ТРЕЩИНЫ) НЕОБХОДИМО
 - а) исключить образцы, как непригодные для гистологического исследования
 - б) провести повторное обезвоживание
 - в) провести повторное пропитывание
 - г) провести повторную заливку

6. ОРИЕНТИРОВАТЬ ОБРАЗЕЦ ПЕРЕД ЗАЛИВКОЙ НЕОБХОДИМО ИНСТРУМЕНТАМИ
 - а) охлажденными (4–8 °С)
 - б) комнатной температуры (18–25 °С)
 - в) горячими (56–57 °С)
 - г) покрытыми парафиновой пленкой

7. ОРИЕНТАЦИЯ ОБРАЗЦА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОСОБО ВАЖНА ПРИ ЗАЛИВКЕ
 - а) фрагмента стенки желудка
 - б) фрагмента легкого
 - в) фрагмента печени
 - г) фрагмента лимфатического узла

8. ЗАЛИТЫЙ В ПАРАФИН ОБРАЗЕЦ МОЖЕТ ХРАНИТЬСЯ
 - а) 12–24 ч
 - б) 1–2 мес.
 - в) до 6 мес.
 - г) годами

9. АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ИЗГОТОВЛЕНИЕ ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ ВОЗМОЖНО С ПОМОЩЬЮ
 - а) инвертоскопа

- б) гистопроцессора
- в) станции для заливки парафином
- г) микротомы

10. АРТЕФАКТЫ ПРИ ЗАЛИВКЕ ОБРАЗЦОВ В ПАРАФИН СВЯЗАНЫ

- а) с воздействием низких температур
- б) с воздействием высоких температур
- в) с химическим взаимодействием углеводородов в составе парафина с образцом
- г) с дегидратацией образцов

ТЕМА 7

МИКРОТОМИЯ

*...Мы и сами прозрачными стали,
Как фигурки из тонкой слюды.
И в большой кристаллической чаше,
С удивлением глядя на нас,
Отраженья неясные наши
Засияли миллионами глаз.*
С. Есенин. Морская прогулка

- 7.1. Виды гистологических срезов.
- 7.2. Техника микротомии.
- 7.3. Перенос парафиновых срезов на предметное стекло.

7.1. Виды гистологических срезов

Микротомия – это приготовление срезов биологических тканей с помощью микротома. Устройство и принцип работы микротома описаны в теме 1.

Срезы толщиной 5–10 мкм называются толстыми. Срезы толщиной 2–5 мкм называются тонкими. Толстые и тонкие срезы получают с помощью микротома с парафиновых блоков. Оптимальная толщина срезов для рутинных гистологических исследований составляет 3–5 мкм.

Срезы толщиной 0,5–2 мкм называются полутонкими. Срезы толщиной 50–100 нм называются ультратонкими. Полутонкие и ультратонкие срезы получают с помощью ультратома с образцов биологического материала, залитых в эпоксидные смолы.

Толстые и полутонкие срезы исследуют с помощью световой микроскопии. Ультратонкие срезы исследуют с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

7.2. Техника микротомии

Перед микротомией блоки рекомендуется охладить (при температуре $+4 - +8$ °С в течение не менее 10 минут или при температуре -20 °С в течение 20–40 с). При охлаждении парафин становится плотнее, что облегчает микротомию. Чрезмерное охлаждение блоков может привести к появлению трещин в парафине, а также отделения парафина от колодки.

В начале работы закрепляют колодку с блоком в объектодержателе микротома (рис. 7.1). Блок устанавливается таким образом, чтобы его поверхность была параллельна микротомному ножу, а при резке нож встречал длинную сторону блока.

После установки блока осуществляется установка микротомного ножа и корректировка угла лезвия. Для микротомии в настоящее время используют одноразовые микротомные лезвия. Разные виды лезвий (различный профиль режущего края) применяются для различного по плотности материала. Угол наклона ножа зависит от конструкции микротома, вида ножа и плотности блока.

Следующим шагом является подведение блока под микротомное лезвие, то есть блок и лезвие сближают под контролем зрения, оставляя минимальное расстояние между ними. Подведение выполняют медленно, чтобы не повредить блок и не деформировать микротомное лезвие.

Подготовка блока к микротомии (грубая подрезка, тримминг) состоит в удалении излишка парафина и выравнивании поверхности среза блока. Для грубой подрезки обычно выставляют шаг 10–20 мкм. После того как поверхность среза блока выровнена, регулятор толщины срезов переводится на 5–6 мкм. Для полировки поверхности среза блока, выполняют еще 1–2 среза толщиной 5–6 мкм. Полировка позволяет удалить рваные дефекты на поверхности среза блока, появляющиеся в результате грубой подрезки. После подрезки и полировки блок пригоден для изготовления срезов.

Лезвие микротомного ножа перед выполнением среза должно быть чистым. Для этого лезвие осторожно очищают от парафина с

помощью кисточки или сложенного в несколько раз фрагмента бинта. Очищать лезвие от парафина необходимо аккуратными движениями, чтобы не деформировать его.

При ручной микротомии срез рекомендуется делать плавными движениями. При автоматической микротомии рекомендуется устанавливать малую скорость резки. Разрывы и деформация парафиновых срезов, появление полос на срезе из-за зазубрин на микротомном лезвии, неравномерная толщина парафинового среза, складки парафинового среза могут сделать гистологический препарат непригодным для анализа. Неравномерный по толщине парафиновый срез может быть получен в результате недостаточной фиксации микротомного лезвия или блока, дефектах фиксации, проводки и заливки образца.

Парафиновый срез с помощью кисточки или препаровальной иглы переносят для расправления с микротомного лезвия на поверхность теплой дистиллированной воды. Автоматические микротомы могут быть оснащены системой переноса срезов, обеспечивающей ламинарный поток воды между режущей кромкой лезвия и водяной баней. Температура воды должна быть ниже температуры плавления парафина (+40 – +50 °С). Низкая температура воды не обеспечит должного расправления парафиновых срезов. Высокая температура воды приведет к расплавлению парафина и деформации среза.

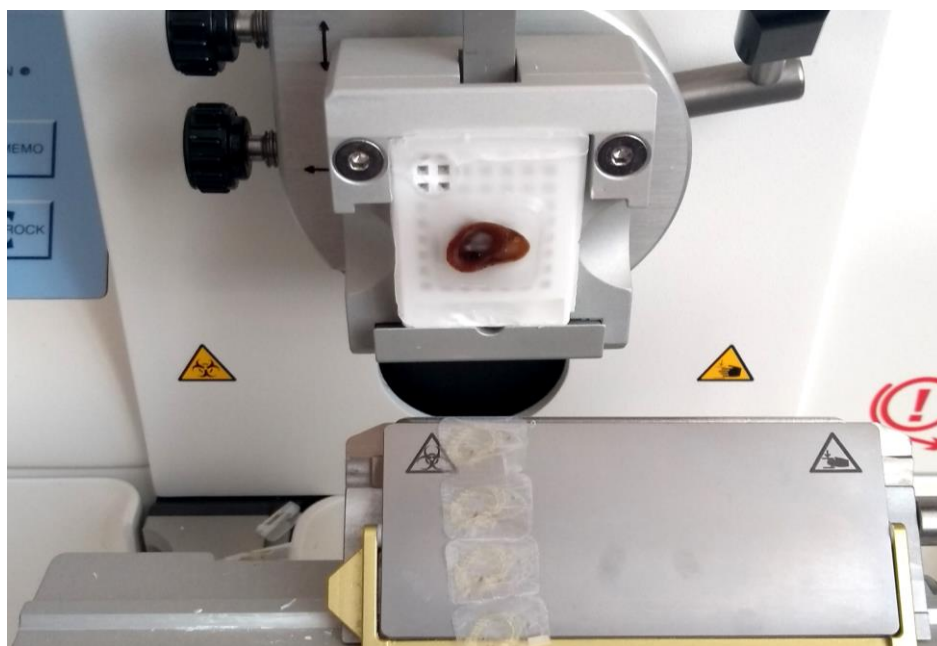


Рис. 7.1. Серия парафиновых срезов, полученных на ротационном микротоме

При переносе парафиновых срезов с микротомного лезвия на поверхность воды для расправления, возможно появление пузырьков воздуха под срезом. Пузырьки воздуха препятствуют адгезии парафиновых среза на предметное стекло. Рекомендуется удалить пузырьки воздуха из емкости с водой перед тем, как переносить на ее поверхность парафиновых срезов.

Дистиллированная вода, используемая для расправления парафиновых срезов, должна быть чистой. Загрязнение образца фрагментами других срезов может быть неправильно интерпретировано.

7.3. Перенос парафиновых срезов на предметное стекло

Срез с поверхности дистиллированной воды емкости водяной бани переносят на предметное стекло. Край промаркированного предметного стекла опускают в водяную баню, после чего кисточкой или препаровальной иглой подводят срез к предметному стеклу. Медленно достают предметное стекло из воды, подхватывая на него парафиновый срез. Парафиновые срезы приклеивают на предметное стекло блестящей, обращенной к микротомному ножу стороной.

Предметные стекла должны быть чистыми, их можно брать только за ребра или за несущий маркировку край. Недопустимо прикасаться к срезам, это может привести как к деформации среза, так и к его загрязнению роговыми чешуйками, микроорганизмами, мелкими инородными телами (пыль, микроскопические фрагменты фильтровальной бумаги или бинта).

Для удаления остатков воды из-под парафинового среза предметное стекло высушивают на нагревательном столике (+37 – +42°C) 30 минут. По некоторым протоколам, рекомендуется просушивать срезы в термостате при +37 °C в течение 6–12 ч. Удаление остатков воды необходимо для лучшей адгезии парафинового среза к предметному стеклу, после чего предметные стекла со срезами можно составлять в штатив и хранить при комнатной температуре.

Перенос на предметное стекло парафиновых срезов с пузырьками воздуха под ними, неполное удаление жидкости из-под среза, не-

достаточная сушка срезов и использование загрязненных предметных стекол может приводить к отклеиванию срезов от предметного стекла при окрашивании.

Для некоторых целей необходимо выполнение серийных срезов (рис. 7.1). Современные микротомы оснащены функцией счетчика срезов, что позволяет точно определить, на какую глубину образца проведена зарезка.

Микротомия сложный процесс, требующий аккуратности, усидчивости и внимательности. Лаборанту-гистологу постоянно приходится сталкиваться с трудным материалом, что обусловлено как характером самого биологического образца (плотность, высокое содержание соединительной ткани, полостей и др.), так и особенностями пробоподготовки: дефекты фиксации, промывки, обезвоживания, заливки сказываются на качестве микротомии. В таблице 2 приведены наиболее частые проблемы, с которыми сталкивается лаборант-гистолог, и пути их решения.

Таблица 2

Проблема	Причина	Пути решения
Срез закручивается	Мягкий парафин	Перезалить образец биологического материала
	Малый угол наклона микротомного лезвия	Увеличить угол наклона микротомного лезвия
	Высокая температура воздуха	Охладить лезвие или парафиновый блок
Срез крошится	Твердый парафин	Перезалить образец биологического материала
	Образец плохо пропитан парафиновой смесью	
	Большой угол наклона микротомного лезвия	Уменьшить угол наклона микротомного лезвия
	Низкая температура воздуха	Подышать на парафиновый блок

На срезе видны полосы	Микротомное лезвие зазубрено	Заменить микротомное лезвие
	Парафин загрязнен	Перезалить образец биологического материала
	Образец недостаточно декальцинирован	Усовершенствовать методику декальцинации
Фрагмент органа выпадает из окружающего парафина	Заливка охлажденным парафином	Перезалить образец биологического материала

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. Приготовить с помощью микротомы 3–5 парафиновых среза.

Этап микротомии

Поместите парафиновые блоки в холодильник.

Ознакомьтесь с принципом устройства микротомы и техникой безопасности при микротомии.

Подготовьте рабочее место: включите нагревательный столик, приготовьте чистый бинт для очистки лезвия, препаровальную иглу и кисточку для переноса срезов, емкость с теплой водой для расправления срезов, предметные стекла, карандаш для маркировки стекол.

Установите блок в объектодержатель микротомы.

Установите микротомное лезвие в держатель ножа (угол наклона ножа 16°).

Подведите парафиновый блок к микротомному лезвию.

Выполните грубую подрезку парафинового блока (толщина срезов 10–20 мкм).

Выполните полировку парафинового блока (1–2 среза толщиной 5 мкм).

Сделайте несколько парафиновых срезов толщиной 5 мкм.

Перенесите парафиновые срезы для расправления в емкость с теплой водой.

Поместите парафиновые срезы на промаркированное чистое пред-

метное стекло.

Подсушите парафиновые срезы на нагревательном столике.

Перенесите предметные стекла с парафиновыми срезами в бокс для хранения.

Снимите держатель ножа и удалите микротомное лезвие, выньте парафиновый блок.

Проведите уборку микротома.

2. Внести в отчет сведения о проделанной работе.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. На гистологических препаратах визуализируются светлые продольные параллельные полосы.

1. *Вследствие чего на гистологических препаратах могут появиться полосы?*
2. *Что нужно сделать, чтобы избежать данного дефекта?*

2. Для расправления парафиновых срезов их переносят с микротомного лезвия в воду. Студент для лучшего расправления парафиновых срезов решил переносить их на горячую воду (90–100 °С).

1. *Можно ли переносить парафиновые срезы на воду такой температуры?*
2. *Какова оптимальная температура воды для расправления парафиновых срезов?*

3. Лаборант-гистолог ненадёжно зафиксировал микротомное лезвие.

К каким артефактам может привести неполная фиксация микротомного лезвия?

4. У студента при приготовлении гистологических препаратов на этапе окраски происходит отделение срезов от предметного стекла.

Какие манипуляции позволят улучшить адгезию среза к предметному стеклу?

5. Студент осуществляет микротомию шейного отдела спинного мозга крысы.

Для каких целей в данном случае важно знать номер серийного среза?

6. Исследователю необходимо составить представление о пространственной организации структуры.

Можно ли с помощью изучения серийных срезов получить подобную информацию?

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ПРИБОР ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗОВ – ЭТО
 - а) инвертоскоп
 - б) гистопроцессор
 - в) станция для заливки парафином
 - г) микротом

2. ВИДЫ МИКРОТОМОВ
 - а) световой
 - б) санный
 - в) ротационный
 - г) атомно-силовой

3. СРЕЗЫ ЗАКРУЧИВАЮТСЯ ПРИ МИКРОТОМИИ ПО ПРИЧИНЕ
 - а) неправильный угол наклона ножа
 - б) неправильная скорость резки
 - в) дефекты заливки (трещины)
 - г) высокая температура окружающей среды

4. НА ПАРАФИНОВОМ СРЕЗЕ ВИДНЫ ПОЛОСЫ, БОРОЗДЫ ПРИ
 - а) неправильный угол наклона ножа
 - б) зазубрины на лезвии ножа
 - в) дефекты заливки (загрязненный парафин)
 - г) низкая температура окружающей среды

5. ЕСЛИ ПРИ МИКРОТОМИИ ОБРАЗЕЦ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ВЫПАДАЕТ ИЗ ПАРАФИНА, НЕОБХОДИМО
 - а) изменить угол наклона ножа

- б) изменить скорость резки
- в) перезалить образец
- г) охладить нож

6. ЕСЛИ ПРИ МИКРОТОМИИ ЧЕРЕДУЮТСЯ СРЕЗЫ БОЛЬШЕЙ И МЕНЬШЕЙ ТОЛЩИНЫ, НЕОБХОДИМО

- а) изменить угол наклона ножа
- б) проверить зафиксированность ножа
- в) проверить зафиксированность блока
- г) охладить нож

7. ПРИ СЛИШКОМ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МОГУТ ВОЗНИКАТЬ ПРОБЛЕМЫ МИКРОТОМИИ –

- а) срезы закручиваются
- б) срезы крошатся
- в) срезы приклеиваются к ножу
- г) срезы неоднородны по толщине

8. ДЛЯ РАСПРАВЛЕНИЯ ПОЛУЧЕННЫЙ НА МИКРОТОМЕ ПАРАФИНОВЫЙ СРЕЗ ПЕРЕНОСЯТ НА ПОВЕРХНОСТЬ

- а) орто-ксилола
- б) воды комнатной температуры (18–25 °С)
- в) теплой воды (34–40 °С)
- г) горячей воды (56–60 °С)

9. ВЫРАВНИВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ СРЕЗА ПЕРЕД НАЧАЛОМ МИКРОТОМИИ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ

- а) с помощью микротомной кисти
- б) с помощью препаровальной иглы
- в) с помощью тонкой подрезки (3–5 мкм)
- г) с помощью грубой подрезки (10–20 мкм)

10. СРЕЗЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, ИМЕЮТ ТОЛЩИНУ

- а) 3–5 мкм
- б) 7–10 мкм
- в) 20 мкм
- г) 60–80 нм

ТЕМА 8

ОКРАСКА ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ

*Тогда <...>
под тверди небес, от зарев алой,
ряд к ряду,
семь тысяч цветов засияло
из тысячи разных радуг.*
В. Маяковский. Война и мир

- 8.1. Подготовка парафиновых срезов к окрашиванию.
- 8.2. Окраска депарафинизированных срезов гематоксилином и эозином.
- 8.3. Заключение окрашенных срезов.

8.1. Подготовка парафиновых срезов к окрашиванию

Срезы толщиной 3–5 мкм полупрозрачны и не позволяют при микроскопии точно идентифицировать структуры. Окраска гистологических срезов – это визуализация структур клеток и тканей, основанная на различном восприятии ими красителей. Окрашиваемость структур тем или иным красителем зависит как от природы самой структуры, так и от физико-химических свойств красителя.

Парафиновые срезы не воспринимают красители, поэтому перед окраской проводят депарафинизацию парафиновых срезов. Для депарафинизации парафиновые срезы инкубируют 10–15 минут в жидкости, растворяющей парафин, наиболее часто используется о-ксилол. После депарафинизации срезы регидратируют: проводят через 2–3 смены этилового спирта и помещают в дистиллированную воду. Регидратированные срезы готовы к окрашиванию.

8.2. Окраска депарафинизированных срезов гематоксилином и эозином

Наиболее распространенной методикой гистологического окрашивания является окраска гематоксилином и эозином, позволяющая провести обзорную микроскопию образца. При необходимости применяются специфические методы окрашивания: по Маллори, по Массону или по Ван Гизону для выявления соединительной ткани, по Перлсу для выявления ионов трехвалентного железа и др.

Окраска гематоксилином и эозином является двойной: гематоксилин является основным красителем и окрашивает ядра клеток и рибосомы; эозин является кислым красителем и окрашивает цитоплазму клеток, а также межклеточное вещество (рис. 8.1). Способность структур окрашиваться тем или иным красителем называется тинкториальными свойствами. Окрашиваемость структур основными красителями называется базофилией. Окрашиваемость структур кислыми красителями называется ацидофилией (оксифилией).

Депарафинизированные и регидратированные срезы из воды переносят в раствор гематоксилина. Продолжительность окрашивания зависит от красителя (гематоксилин Эрлиха, гематоксилин Джилла, гематоксилин Гарриса и др.) и от природы образца. Развитие окрашивания рекомендуется контролировать под микроскопом. Перед помещением срезов на предметный столик микроскопа, их ополаскивают от излишка красителя в дистиллированной воде. Окрашивание гематоксилином считается достаточным, если ядра клеток приобрели интенсивный вишневым цвет, в ядрах различимы ядрышки, эухроматин и гетерохроматин. Если ядра слабо окрашены, то необходимо увеличить время экспозиции срезов в гематоксилине. Если ядра переокрашены, то ослабить окрашивание (дифференцирование окрашивания) можно ополаскиванием срезов в течение 1–2 с в солянокислом спирте.

Из гематоксилина или солянокислого спирта срезы переносят в дистиллированную воду для удаления излишка красителя. Далее срезы помещают в водопроводную воду до изменения цвета окрашива-

ния с вишневого на фиолетовый. В водопроводной воде всегда присутствуют ионы щелочноземельных металлов, взаимодействие которых с гематоксилином необходимо для изменения свойств красителя.

Далее срезы переносят в раствор эозина, развитие окрашивания также контролируют с помощью микроскопа. Окрашивание эозином считается достаточным, если структуры, воспринимающие краситель, имеют яркий розово-оранжевый цвет. Если цвет окрашивания бледно-розовый, необходимо увеличить время экспозиции срезов в эозине. Если цвет интенсивно красный, то препарат перекрашен и ослабить окрашивание можно промывкой срезов в дистиллированной воде или этиловом спирте.

После окрашивания эозином срезы последовательно проводят через батарею из 2–3 этиловых спиртов для обезвоживания срезов. Обезвоживание необходимо проводить быстро, так как в спиртах эозин вымывается и интенсивность окрашивания снижается. Из этилового спирта срезы переносят в о-ксилол, для приобретения ими прозрачности – просветление срезов.

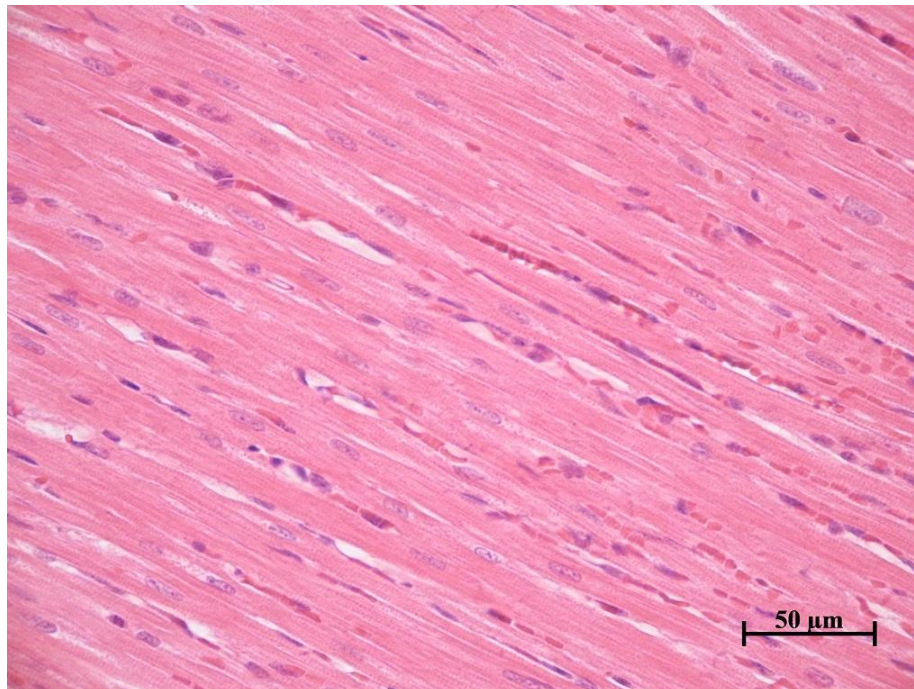


Рис. 8.1. Гистологический препарат, окрашенный гематоксилином и эозином

Неполная депарафинизация и регидратация приводят к неравномерному окрашиванию среза. Использование старых или некаче-

ственных красителей приводит к тому, что окраска тканей не развивается, препарат теряет диагностическую ценность. Недостаточная дегидратация препятствует просветлению среза.

8.3. Заключение окрашенных срезов

Заключение окрашенных срезов под покровное стекло – это процедура, позволяющая длительно сохранять окрашенный срез без изменения его свойств. Заключенный окрашенный маркированный срез называют гистологическим препаратом.

Перед заключением окрашенных срезов под стекло проводят их просветление в о-ксилоле. Не допуская высыхания окрашенных срезов, на них наносят монтирующую среду (среду для заключения) и накрывают сверху покровным стеклом так, чтобы все пространство между предметным и покровным стеклом было заполнено монтирующей средой, а пузырьков воздуха не оставалось. Гистологические препараты оставляют горизонтально до полного затвердевания монтирующей среды при комнатной температуре.

Монтирующие среды должны быть прозрачными, иметь коэффициент преломления, близкий к коэффициенту преломления стекла, и не взаимодействовать с красителями. Наиболее распространенными монтирующими средами являются канадский бальзам и синтетические среды (полистирол, акриловые смолы и др.).

Высыхание окрашенных срезов перед заключением или появление воздушных пузырей на этапе заключения приводят к появлению темного контура структур и к потере диагностической ценности гистологического препарата.

Использование грязных покровных стекол, попадание в монтирующую среду пыли, волос и др. снижает качество гистологического препарата.

Для получения сопоставимых гистологических препаратов необходимо четко придерживаться протокола окраски. Окрашенные в различных условиях гистологические препараты сравнивать сложно, а в некоторых случаях недопустимо.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

Приготовить гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином.

1. Депарафинизировать парафиновые срезы, после чего перенести их через батарею спиртов в дистиллированную воду.

Этап депарафинизации	Продолжительность
о-ксилол	15 мин
Этиловый спирт № 1, 95°	1–2 мин
Этиловый спирт № 2, 95°	1–2 мин
Этиловый спирт № 3, 95°	1–2 мин
Дистиллированная вода	3–5 мин

2. Провести окрашивание гематоксилином и эозином, согласно протоколу. Развитие окрашивания контролировать под микроскопом.

Этап окрашивания	Продолжительность
Гематоксилин	2–4 мин, контроль зрением
Дистиллированная вода	1 мин
Водопроводная вода	5 мин
Эозин	2–4 мин, контроль зрением

3. Через батарею спиртов перенести окрашенные срезы в о-ксилол для просветления.

Этап просветления	Продолжительность
Этиловый спирт № 1, 95°	1–2 мин
Этиловый спирт № 2, 95°	1–2 мин
Этиловый спирт № 3, 95°	1–2 мин
о-ксилол	15 мин

4. ЗаклЮчить окрашенные срезы под покровное стекло.

5. Внести в отчет сведения о проделанной работе.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. Студент пропустил стадию депарафинизации парафиновых срезов перед их окрашиванием.

Почему гематоксилин и эозин не окрашивают недепарафинизированные срезы?

2. После депарафинизации в о-ксилоле студент сразу поместил срезы в раствор красителя – гематоксилина.

Предположите, будут ли окрашиваться депарафинизированные срезы? Почему?

3. В гистологическую лабораторию поступили новая партия красителей. Лаборант-гистолог, зная это, внимательно подошел к процедуре окрашивания. Развитие окраски депарафинизированного среза лаборант-гистолог контролировал с помощью микроскопа, хотя обычно окрашивает препарат фиксированное по протоколу время.

Почему лаборант отошел от протокола?

4. После окрашивания гематоксилином депарафинизированные срезы необходимо помещать не в дистиллированную, а в водопроводную воду.

Почему?

5. Студент оставил депарафинизированный срез в растворе гематоксилина не на 3 минуты, а на 15 минут.

С помощью какого раствора можно дифференцировать окрашенный срез, то есть удалить излишек гематоксилина?

6. Студент перекрасил депарафинизированные срезы спиртовым раствором эозина.

С помощью какого раствора можно удалить излишек эозина?

7. После окрашивания срезы просветляют в о-ксилоле и, не высушивая, заключают под покровное стекло.

Что будет, если после окраски дать окрашенным срезам высохнуть?

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ОКРАШИВАНИЕ ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ
 - а) обзорной микроскопии
 - б) выявления коллагеновых волокон
 - в) выявления мукополисахаридов
 - г) выявления ионов трехвалентного железа
2. ГЕМАТОКСИЛИН ЯВЛЯЕТСЯ
 - а) основным красителем
 - б) кислым красителем
 - в) нейтральным красителем
 - г) гидрофобным красителем
3. ЭОЗИН ЯВЛЯЕТСЯ
 - а) основным красителем
 - б) кислым красителем
 - в) нейтральным красителем
 - г) гидрофобным красителем
4. ЯДРА ОКРАШИВАЮТСЯ
 - а) гематоксилином
 - б) эозином
 - в) водой
 - г) масляной краской
5. БАЗОФИЛИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ ОБУСЛОВЛЕНА НАЛИЧИЕМ
 - а) рибосом и гранулярного ЭПР
 - б) эндосом и лизосом
 - в) цитоскелета
 - г) нитей ахроматинового веретена деления
6. ЛИПИДНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ ПРИ ОКРАШИВАНИИ КЛЕТОК ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ
 - а) окрашиваются базофильно
 - б) окрашиваются оксифильно

- в) не окрашиваются
- г) окрашиваются обоими красителями

7. СВОЙСТВО СТРУКТУР ОКРАШИВАТЬСЯ КИСЛЫМ КРАСИТЕЛЕМ – ЭТО

- а) базофилия
- б) эозинофилия
- в) оксифилия
- г) ацидофилия

8. СВОЙСТВО СТРУКТУР ОКРАШИВАТЬСЯ ТЕМ ИЛИ ИНЫМ КРАСИТЕЛЕМ – ЭТО

- а) амфифильные свойства
- б) тинкториальные свойства
- в) метахромазия
- г) анизотропия

9. ДЛЯ ДЕПАРАФИНИЗАЦИИ СРЕЗА ПЕРЕД ОКРАШИВАНИЕМ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

- а) дистиллированная вода
- б) ксилол
- в) солянокислый спирт
- г) этанол

10. ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ ОКРАШЕННЫХ ГЕМАТОКСИЛИНОМ СТРУКТУР ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

- а) дистиллированная вода
- б) о-ксилол
- в) солянокислый спирт
- г) этанол

ТЕМА 9

МИКРОСКОПИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Налево посмотришь – мамочка мать!

Направо – мать моя мамочка!

В. Маяковский. Бродвей

...солнце моноклем

вставлю в широко растопыренный глаз.

В. Маяковский. Облако в штанах

9.1. Подготовка к работе светового микроскопа.

9.2. Алгоритм описания структуры органов.

9.1. Подготовка к работе светового микроскопа

Устройство светового микроскопа кратко описано в теме 1.

Начинать работу со световым микроскопом необходимо с настройки освещения. Необходимо добиться равномерно освещенного поля (светлопольная микроскопия). Для этого следует установить объектив малого увеличения на расстояние 1 см от предметного столика, открыть диафрагму и поднять конденсор в крайнее верхнее положение. Далее установить освещение в поле зрения микроскопа, используя электроосветитель или зеркало. Если микроскоп снабжен электроосветителем, то необходимо включить лампу микроскопа и установить необходимую интенсивность освещения поля зрения. При использовании в качестве источника освещения естественного света, следует изменить положение зеркала таким образом, чтобы свет направлялся в сторону объектива.

Микроскопию всегда начинают с исследования гистологического препарата на малом увеличении. Изучение гистологического препарата на малом увеличении позволяет просмотреть его целиком и выбрать области для более детального рассмотрения на большем увеличении микроскопа.

Для микроскопии на малом увеличении необходимо убедиться, что в рабочее положение установлен объектив малого увеличения и что он находится на расстоянии 1 см от предметного столика. На предметный столик помещают гистологический препарат (покровным стеклом вверх). Под контролем зрения, объектив опускают до тех пор, пока расстояние между линзой объектива и гистологическим препаратом не станет 4–5 мм. Глядя в окуляр, с помощью макровинта медленно и плавно поднимают объектив, увеличивая расстояние между линзой объектива и гистологическим препаратом до необходимого фокусного расстояния. Если фокусировка не удалась, следует повторить процедуру. Стоит отметить, что сближение объектива и гистологического препарата всегда осуществляется под контролем зрения, что позволяет избежать повреждения гистологического препарата и линзы объектива. Напротив, если опускать объектив «вслепую», глядя в окуляр, то можно вдавить объектив в гистологический препарат и повредить их.

Передвигая гистологический препарат рукой или с помощью препаратопроводителя, следует изучить весь гистологический препарат и выбрать область интереса. Для того, чтобы настроить область интереса на большем увеличении микроскопа, нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа на малом увеличении. Затем, поворачивая револьверное устройство, приводят в рабочее положение объектив большего увеличения и с помощью макровинта настраивают фокус.

По окончании работы с гистологическим препаратом, необходимо установить малое увеличение микроскопа, поднять объектив, снять с рабочего столика гистологический препарат. Микроскопы рекомендуется зачехлять или хранить в шкафах.

9.2. Алгоритм описания структуры органов

Описание препарата необходимо начинать с указания типа препарата (срез, пленочный препарат, мазок, мазок-отпечаток, тотальный

препарат, соскоб и др.) и определения объекта изучения (название ткани, название органа). Далее указывается метод окраски. Затем следует собственно описание микроскопического строения объекта изучения сначала на малом увеличении, после – на большом увеличении микроскопа. Описание микроскопического строения органа начинается с указания типа его строения: паренхиматозный, полый (слоисто-оболочечный) или смешанный.

При описании строения паренхиматозного органа сначала дается характеристика стромы, затем паренхимы. Указывается, какими компонентами (капсула, трабекулы) представлена строма и какой тканью (какими тканями) она образована. При необходимости дается детальная характеристика клеток и межклеточного вещества стромы. В составе стромы описываются кровеносные сосуды, лимфатические сосуды, нервы и нервные узлы. Описание паренхимы начинается с определения вида ткани, образующего паренхиму. При наличии в органе определяют и характеризуют структурно-функциональные единицы. Далее переходят к детальной характеристике клеток паренхимы.

При описании строения полого органа или сосуда сначала перечисляются слои, образующие стенку, после чего дается их характеристика. Общая характеристика слоя заключается в определении ткани, его образующей. Детальная характеристика слоя заключается в описании особенностей строения клеток и компонентов межклеточного вещества. Особое внимание уделяется наличию в составе слоя желез, лимфоидных фолликулов, нервных узлов.

Некоторые органы сочетают в себе черты паренхиматозных и полых органов. В таких органах одна из стенок намного превосходит по объему остальные, в ее составе можно описать компоненты стромы и паренхимы.

Стоит отметить, что некоторые органы имеют уникальную организацию (например, внутреннее ухо) и не могут быть отнесены ни к одной из вышеупомянутых групп. Для описания органов с уникальным строением также применим принцип от общего к частному, с указанием особенностей кровоснабжения и иннервации.

Для морфофункциональной характеристики состояния органа помимо описательной морфологии иногда необходимо провести количественную оценку клеточных и тканевых показателей. Гистологическое и цитологическое исследование часто дополняется морфометрическими исследованиями для более точного и обоснованного заключения о морфофункциональном состоянии структуры.

Иногда обзорная микроскопия выявляет необходимость использования специальных методов световой микроскопии.

Ультрафиолетовая микроскопия повышает разрешающую способность микроскопа, так как ультрафиолет характеризуется меньшей длиной волны, чем видимый свет.

Флюоресцентная микроскопия основана на регистрации флюоресценции клеточных компонентов. Молекулы могут обладать свойствами флюоресценции (аутофлюоресценция) или могут быть специфически помечены флюоресцентными красителями.

Темнопольная и фазово-контрастная микроскопия применяется для изучения живых неокрашенных объектов. В темнопольном микроскопе используется боковое освещение объекта. Объект, освещенный рассеянным светом, кажется светлым на темном фоне. Принцип фазово-контрастной микроскопии основан на свойстве биологических структур, прозрачных для видимого света, изменять фазу проходящих через них лучей.

Поляризационная микроскопия основана на свойстве анизотропии (двойного лучепреломления) структур в клетках и тканях и используется для исследования объектов с упорядоченным расположением молекул.

После описания световой микроскопии невозможно не упомянуть об электронной микроскопии.

Электронная микроскопия – метод, при котором для получения изображения вместо света используют поток электронов. Пучок электронов проходит через образец при трансмиссионной электронной микроскопии. Пучок электронов отражается от поверхности образца при сканирующей электронной микроскопии. Применение электронной микроскопии позволило изучить ультраструктуру клеток и меж-

клеточного вещества. Электронная микроскопия, безусловно, не относится к рутинным методам морфологического исследования клинического материала.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. С помощью светового микроскопа изучить на малом и большом увеличении гистологический препарат. Идентифицировать гистологический препарат по структурным признакам.
2. Внести в отчет сведения о проделанной работе.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Ситуационные задачи

1. Представьте, что Вам поручили обучить первокурсника микроскопии.

Приведите как можно больше аргументов в пользу того, что микроскопию гистологического препарата всегда необходимо начинать с малого увеличения микроскопа.

2. В лабораторию для гистологического анализа направлен биоптат печени.

1. К какому типу органов относится печень: с паренхиматозным типом строения, полым или смешанным?

2. Сформулируйте план для описания гистологического препарата печени.

3. Перепончатая улитка внутреннего уха является органом с атипичной организацией.

Сформулируйте план для описания гистологического препарата спирального органа.

4. Представьте, что Вы планируете исследование по изучению токсического действия лекарственного препарата на почку.

Какой вид микроскопии из предложенных Вы бы предпочли: (1) светлопольная; (2) темнопольная; (3) трансмиссионная электронная?

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ОПТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА ВКЛЮЧАЕТ
 - а) конденсор
 - б) объектив
 - в) микровинт
 - г) окуляр

2. УКАЖИТЕ ПРИМЕРНОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА ПРИ ОПТИЧЕСКОЙ СИЛЕ ОБЪЕКТИВА $\times 40$, ОКУЛЯРА $\times 10$
 - а) 10
 - б) 40
 - в) 100
 - г) 400

3. СВЕТЛОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ ПОЗВОЛЯЕТ ИЗУЧАТЬ ОБРАЗЦЫ
 - а) неокрашенные
 - б) окрашенные
 - в) обладающие свойством двойного лучепреломления
 - г) обладающие аутофлуоресценцией

4. ВИД МИКРОСКОПИИ, КОТОРЫЙ НЕОБХОДИМО ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ АНАЛИЗА УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛЕТОК –
 - а) светлопольная микроскопия
 - б) темнопольная микроскопия
 - в) фазово-контрастная микроскопия
 - г) трансмиссионная электронная микроскопия

5. ВАКУУМНЫМ ЭЛЕКТРОННО-ОПТИЧЕСКИМ ПРИБОРОМ ЯВЛЯЕТСЯ
 - а) трансмиссионный электронный микроскоп
 - б) растровый электронный микроскоп
 - в) атомно-силовой микроскоп
 - г) поляризационный микроскоп

6. ВИД МИКРОСКОПИИ, КОТОРЫЙ НЕОБХОДИМО ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУР, ОБЛАДАЮЩИХ СВОЙСТВОМ ДВОЙНОГО ЛУЧЕПРЕЛОМЛЕНИЯ
- а) фазово-контрастная микроскопия
 - б) растровая электронная микроскопия
 - в) поляризационная микроскопия
 - г) люминесцентная микроскопия
7. ИЗУЧЕНИЕ ВИРТУАЛЬНЫХ СРЕЗОВ ВОЗМОЖНО МЕТОДОМ
- а) поляризационной микроскопии
 - б) трансмиссионной электронной микроскопии
 - в) растровой электронной микроскопии
 - г) конфокальной микроскопии
8. УВЕЛИЧЕНИЯ В 100 000 РАЗ МОЖНО ДОБИТЬСЯ С ПОМОЩЬЮ
- а) поляризационного микроскопа
 - б) трансмиссионного электронного микроскопа
 - в) светлопольного микроскопа
 - г) конфокального микроскопа
9. РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА –
- а) 200 мкм
 - б) 0,01 мкм
 - в) 0,2 мкм
 - г) 1–2 мкм
10. РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА ЗАВИСИТ ОТ
- а) увеличения микроскопа
 - б) длины волны источника света
 - в) способа фиксации образца
 - г) количества используемых красителей

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

ТЕМА 1. ОСНАЩЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

- 1.** Обязательными в гистологической лаборатории являются: микротом, микроскоп, общелабораторное оборудование (термостат, холодильник, весы, дистиллятор, рН-метр и др.).
- 2.** Работа в морфологической лаборатории сопряжена с химическими (спирты, кислоты, летучие токсичные соединения), биологическими (биопсийный и аутопсийный материал) и физическими (легковоспламеняющиеся соединения, открытый огонь спиртовки, расплавленный парафин) вредными факторами. Минимизировать воздействие вредных факторов на работников лаборатории позволяет грамотно оборудованное рабочее место, соблюдение правил техники безопасности и использование средств индивидуальной защиты.

ТЕМА 2. ЗНАКОМСТВО С МЕТОДИКОЙ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

- 1.** Обязательное гистологическое исследование первичного опухолевого очага необходимо для определения степени тканевой и клеточной атипии. На основании гистологического или цитологического исследования ставится диагноз: доброкачественная или злокачественная опухоль. Лимфогенный путь метастазирования – один из наиболее распространенных. Анализ регионарных лимфатических узлов проводят для выявления метастазов опухоли.
- 2.** Взятие буккального эпителия – легкая в исполнении и неинвазивная процедура, которую проводят для генетического определения пола спортсменов.
- 3.** Морфологическое исследование необходимо для оценки влияния препарата на опухолевый рост. Только на гистологическом и цитологическом уровне можно оценить степень атипии клеток опухоли.

ТЕМА 3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА К ГИСТОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ

- 1.** Студент должен приготовить фиксирующую жидкость для взятых образцов.
- 2.** Для заливки биологического материала нужно должным образом подготовить парафин: расплавить.
- 3.** Парафиновые срезы требуют депарафинизации в о-ксилоле и регидратации в спирте этиловом. Непосредственно для процедуры окрашивания необходимо приготовить растворы красителей и воду для промывки срезов. Емкости с этиловым спиртом и о-ксилолом необходимы для дегидратации и просветления срезов. Для заключения окрашенных срезов нужно приготовить среду для заключения.

ТЕМА 4. ВЗЯТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ЕГО ФИКСАЦИЯ

- 1.** (1) Этиловый спирт применяется в качестве фиксатора для гистологического исследования. (2) Поместить образцы в физиологический раствор допустимо на несколько минут или часов, однако после необходимо их переложить в емкость с фиксирующей жидкостью. (3) Помещать образцы в воду не рекомендуется, даже на непродолжительное время, так как это приведет к их набуханию и повреждению клеток.
- 2.** Соотношение образца и фиксирующей жидкости должно быть 1:20.
- 3.** Скорость проникновения фиксатора в ткань ограничена, поэтому образец большого размера в центре не профиксируется.
- 4.** Маркировку образцов проводят одновременно с процедурой взятия образцов. В некоторых случаях флаконы маркируют заблаговременно: взятые образцы помещают в приготовленный для них флакон.
- 5.** Перфузия фиксирующей жидкостью.

ТЕМА 5. ПРОМЫВКА, ВЫРЕЗКА И ПРОВОДКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

- 1.** Замороженные образцы не промывают. Фиксированные в формалине образцы перед проводкой от формалина необходимо отмыть.
- 2.** После фиксации в формалине материал уплотняется, из-за чего вырезку проводить удобнее. Вырезка материала заключается в придании образцу нужной формы и размера, подравнивании краев, отсечении ненужных участков.
- 3.** Для фиксации, промывки, проводки, заливки и формирования блоков.
- 4.** Обезвоживать замороженные биологические образцы не надо, так как они обладают достаточной твердостью для микротомии. Фиксированные в формалине образцы требуют дальнейшей заливки в парафин (гидрофобен), поэтому требуют процедуры обезвоживания.
- 5.** Декальцинация.
- 6.** Парафин и эпоксидные смолы не смешиваются с водой. Чтобы образцы равномерно пропитались в парафине или смолах, образцы нужно обезводить.

ТЕМА 6. ФОРМИРОВАНИЕ ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ

- 1.** На этапе заливки расплавленным парафином.
- 2.** В обоих случаях рекомендуется перезаливка образцов.
- 3.** Помещать образец непосредственно на дно формы для заливки.
- 4.** Для образцов целесообразно использование соответствующей по размеру формы для заливки. Таким образом, для заливки почки потребуются форма большего размера. Для заливки мочеточника лучше использовать заливочную форму меньшего размера.
- 5.** Для фрагмента печени ориентировка значения не имеет. Для фрагмента почки ориентация важна, так как почка имеет зональное строение.

ТЕМА 7. МИКРОТОМИЯ

1. Полосы могут появляться на срезе, если у лезвия микротомного ножа есть дефекты (искривления, зазубрины). Необходимо пользоваться ровными и острыми лезвиями.
2. Оптимальная температура воды для расплавления парафиновых срезов составляет 40–50 °С. Перенос срезов на воду 90–100 °С приведет к расплавлению парафина и деформации среза.
3. К получению среза, неоднородного по толщине.
4. После переноса среза на предметное стекло рекомендуется в течение получаса высушивать препарат на нагревательном столике. Это способствует удалению излишка воды из-под среза и лучшей адгезии среза на предметном стекле.
5. Для определения сегмента спинного мозга при микротомии необходимо знать, на какой глубине образца получен срез. Номер серийного среза и толщина каждого среза дают информацию, как глубоко студент зарезался в гистологический блок.
6. Анализ серийных срезов дает возможность воссоздать трехмерную организацию изучаемой структуры.

ТЕМА 8. ОКРАСКА ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ

1. Гематоксилин и эозин являются водными красителями и не окрашивают пропитанные гидрофобным парафином срезы.
2. О-ксилол гидрофобен, поэтому не отмытые от него срезы не будут воспринимать водный краситель гематоксилин.
3. Способность красителя окрашивать снижается с течением времени. Кроме того, один и тот же краситель одного изготовителя и поставщика может несколько отличаться по свойствам от партии к партии. Чтобы избежать дефектов окраски (перекрашивание, слабая интенсивность окрашивания) большого количества препаратов, при первом использовании красителя из новой партии развитие окрашивания рекомендуется контролировать под микроскопом.

4. Гематоксилин, связываясь с ионами щелочноземельных металлов, меняет цвет. В водопроводной воде достаточная концентрация щелочноземельных металлов для взаимодействия с гематоксилином.
5. С помощью солянокислого спирта.

ТЕМА 9. МИКРОСКОПИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

1. Микроскопия на малом увеличении позволяет произвести обзор всего препарата и выбор области интереса для последующего рассмотрения на большем увеличении. При малых размерах среза поместить его в поле зрения намного проще при малом увеличении микроскопа.
2. Печень является паренхиматозным органом. Необходимо охарактеризовать строму (капсула, перегородки), затем паренхиму (печеночные дольки) печени. Описать степень выраженности стромы, детально охарактеризовать триады. Описать структурные особенности гепатоцитов центральной, средней и периферической зон печеночной дольки.
3. Охарактеризовать строение стенок костного лабиринта, затем перепончатого лабиринта улитки внутреннего уха. Обратит внимание на кровеносные сосуды, нервы и спиральный узел улитки внутреннего уха. Описать строение кортиева органа: поддерживающих и сенсорных эпителиоцитов.
4. Если поставлена задача выявить микро- и ультраструктурные изменения, то светлопольная микроскопия с последующей трансмиссионной электронной микроскопией.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

ТЕМА 1. ОСНАЩЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	а, б, в	6	б, в, г
2	а	7	а, б
3	а	8	в
4	г	9	в
5	а, б, в	10	г

ТЕМА 2. ЗНАКОМСТВО С МЕТОДИКОЙ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	а	6	б
2	а	7	в
3	а	8	а, в, г
4	б	9	а
5	в	10	а

ТЕМА 3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА К ГИСТОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	а, б	6	б, в, г
2	в	7	в
3	б	8	в
4	а, г	9	г
5	в, г	10	а, в

ТЕМА 4. ВЗЯТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ЕГО ФИКСАЦИЯ

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	б	6	б
2	а	7	а
3	в, г	8	г
4	а, б	9	в
5	в	10	а

**ТЕМА 5. ПРОМЫВКА, ВЫРЕЗКА
И ПРОВОДКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	б	6	б
2	г	7	в
3	а, б	8	а
4	а, б	9	а, б
5	а	10	а, в

ТЕМА 6. ФОРМИРОВАНИЕ ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	а	6	в
2	б	7	а, г
3	в	8	г
4	г	9	в
5	г	10	б

ТЕМА 7. МИКРОТОМИЯ

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	г	6	б, в
2	б, в	7	б
3	а, г	8	в
4	б	9	г
5	в	10	а

ТЕМА 8. ОКРАСКА ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	а	6	в
2	а	7	б, в, г
3	б	8	б
4	а	9	б
5	а	10	в

ТЕМА 9. МИКРОСКОПИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1	а, б, г	6	в
2	г	7	г
3	б	8	б
4	г	9	в
5	а, б	10	б

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Мальков, П. Г. Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике / П. Г. Мальков – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 176 с. – ISBN 978-5-9704-3009-5. – Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. – URL : <https://ezproxy.ssmu.ru:2877/book/ISBN9785970430095.html> (дата обращения: 20.04.2023). – Режим доступа : по подписке.
2. Корьяк, В. А. Основы гистологической техники : учебное пособие / В. А. Корьяк, Л. А. Николаева. – Иркутск : ИГМУ, 2020. – 85 с. – Текст : электронный // ЭБС «Букап» : [сайт]. – URL : <https://www.books-up.ru/ru/book/osnovy-gistologicheskoy-tehniki-15664068/> (дата обращения: 20.04.2023). – Режим доступа : по подписке.

Дополнительная

1. Быков, В. Л. Гистология, цитология и эмбриология. Руководство к практическим занятиям. Атлас : учебное пособие / В. Л. Быков. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 1032 с. – ISBN 978-5-9704-5225-7. – Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. – URL : <https://ezproxy.ssmu.ru:2058/book/ISBN9785970452257.html> (дата обращения: 31.08.2022). – Режим доступа : по подписке.

Учебное издание

Вера Владимировна Иванова
Иван Васильевич Мильто
Анна Николаевна Дзюман
Ольга Николаевна Серебрякова
Екатерина Даниловна Порохова
Ирина Владимировна Суходоло

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРАКТИКУМ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Редактор Харитоновна Е.М.
Технический редактор Коломийцева О.В.
Обложка Иванова В.В.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. +7 (3822) 901–101, доб. 1760
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 28.05.2023 г.
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. л. 5,1. Авт. л. 2,6
Тираж 100 экз. Заказ № 20

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru