

В. В. СМЯЧЕНКО
С. А. БАРАШКОВА
В. И. ПОЗДРИН
В. П. АРТЕМЬЕВ

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ
ТЕХНИКА

+ 616-07



Омск - город моей жизни, город современный, кипящий, энергичный. Энергия омских проспектов, современных жилых и культурных комплексов дает нам заряд вдохновения и жизненной силы. С другой стороны, энергия Омска - это потенциал его людей, питающих город своим творческим зарядом. «Омскэнерго» старается поддерживать творчески одаренных людей, людей стремящихся внести свой вклад в развитие Омска.

Я с удовольствием представляю новую книгу наших давних друзей - сотрудников Омской медицинской академии. Омская государственная медицинская академия отмечает в эти дни свой 85-летний юбилей. Этой дате посвящена книга «Гистологическая техника», первые издания которой уже получили признание среди специалистов. Это труд творческого коллектива, заряженного энергией любви к своему делу. Представляя это издание, мы раскрываем еще одну грань самобытности жизнеутверждающей энергии жителей нашего города.

A stylized, cursive handwritten signature in black ink, appearing to read 'Александр Антропенко'.

Александр АНТРОПЕНКО
Генеральный директор АК «Омскэнерго»

611.018
С 308

Министерство здравоохранения и социального развития
Российской Федерации

Омская государственная медицинская академия

Омский научно-исследовательский центр СО РАМН

Медицинский институт Орловского государственного Университета

Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды»

Омский государственный республиканский медицинский колледж

В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В.И.Ноздрин,
В.Н.Артемов

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА

*Рекомендуется учебно-методическим объединением
по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов
России в качестве учебного пособия
для студентов медицинских вузов и сузов*

*В дар
Самаркандскому
медицинскому техникуму
(5 марта)*

Омск-Орел - 2006



УДК 611+ 616 – 07 (075.32)

ББК 28. 866 в + 52. 511

С 308

В.В. Семченко – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент СО АН ВШ, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Омской государственной медицинской академии, руководитель научно-исследовательской лаборатории гипоксических повреждений мозга и нейрореабилитации Омского научно-исследовательского центра СО РАМН, научный руководитель центра экстренной неврологии Омской городской клинической больницы скорой медицинской помощи №1, консультант отделения нейротравма-реанимации Омской городской клинической больницы №1.

С.А. Барашкова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омской государственной медицинской академии.

В.И. Ноздрин – доктор медицинских наук, профессор, академик Российской академии естественных наук, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии медицинского института Орловского государственного университета, директор фармацевтического научно-производственного предприятия «Ретиноиды».

В.Н. Артемьев – кандидат медицинских наук, доцент, директор Омского медицинского колледжа Росздрава, заслуженный учитель РФ.

Рецензенты:

Заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Новосибирской государственной медицинской академии, доктор медицинских наук, профессор Ю.И. Склянов; доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова А.Н. Яцковский.

Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.И., Артемьев В.Н.. Гистологическая техника: учебное пособие. – 3-е изд., доп. и перераб. – Омск-Орел: Омская областная типография, 2006. – 290 с.

Данное пособие содержит сведения по применению современных микроскопических методов исследования в гистологических лабораториях. Описаны этапы и методы обработки тканей и органов для микроскопического изучения на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях.

Предназначено для студентов высших и средних учебных медицинских заведений, а так же для лаборантов-гистологов, цитологов, патологоанатомов, судебных медиков и специалистов по лабораторной диагностике.

ISBN 5-87367-025-0

© В.В.Семченко, С.А.Барашкова, В.И.Ноздрин, В.Н.Артемьев, 2006

© Омская государственная медицинская академия, 2006



ГЛАВА 1

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ И ОСНАЩЕНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1.1. Ведение учетно-отчетной документации

Для эффективного использования рабочего времени, удобства пользования архивными материалами, предупреждения ошибок в результатах гистологических исследований необходимо правильно и аккуратно вести учетную документацию.

Необходимо иметь журналы для регистрации исследуемых материалов, журналы протоколов вскрытий, заключений по результатам исследований. Документальный архив хранится по возможности долго, но не менее 25 лет. В последнее время, в связи с широким внедрением компьютерной техники и увеличением объема исследуемых биопсийных и секционных материалов, использование и хранение бумажной документации становится не обязательным.

В течение многих лет успешно применяются информационно-справочная система «Аутопсия», аппаратно-программные комплексы «ДиаМорф». Такие и некоторые другие компьютерные программы позволяют хранить и анализировать материал, как мелких лабораторий, так и крупных учреждений, исследующих в год десятки тысяч образцов биопсийного, секционного и экспериментального материала.

Кроме документальных материалов, необходимо сохранять фрагменты органов и тканей, блоки и гистологические препараты, оставшиеся после исследования.

1.2. Хранение исследуемого материала



Макроархив («сырой» архив) хранят в 10% растворе нейтрально-го формалина (если формалин использовался для фиксации) в емкостях с плотно закрывающимися крышками. При этом необходимо постоянно контролировать уровень жидкости, предупреждая высыхание материалов. Каждый образец в общей емкости должен иметь маркировку. Для этого его помещают в марлевый мешочек с этикеткой из

плотной, пропитанной воском бумаги или фотобумаги, с обозначением номера, написанного тушью или простым карандашом, по которому в архиве расшифровывают его принадлежность.

Оставшиеся фрагменты органов и тканей можно хранить при комнатной температуре в прозрачных полиэтиленовых пакетах, в которые наливают небольшое количество формалина, укладывают этикетки, а затем герметично закупоривают. Такой способ позволяет хранить большой объем материала на небольших площадях. Поиск необходимых образцов при этом не занимает много времени, исключается нежелательный прямой контакт с фиксатором.

Сроки хранения «сырого архива» не регламентируются нормативными актами. Если позволяют площади, то материалы хранят в течение года. Образцы органов и тканей с неясной или редко встречающейся патологией рекомендуется хранить в течение более длительного периода.

Парафиновые блоки хранят в коробках на стеллажах при комнатной температуре. Необходимо учитывать, что материал в блоках – излюбленное лакомство для грызунов и насекомых, поэтому возможность их контакта лучше исключить. Целлоидиновые блоки снимают с деревянных брусков и хранят промар-

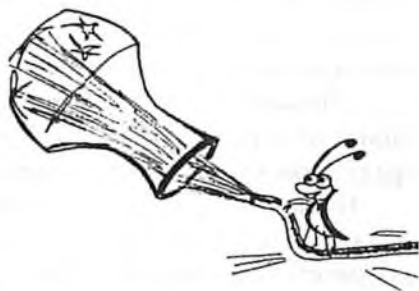
кированными в 70% спирте. Гистологические препараты рекомендуется хранить вертикально – в коробках или на стеллажах, имеющих специальные прорези, лучше в темноте, чтобы задержать обесцвечивание. Особенностью полутонких срезов является то, что они очень слабо связывают красители. С течением времени препарат обесцвечивается из-за диффузии красителя в материал, использующийся для заключения срезов. Поэтому полутонкие срезы лучше изучать без заключения в светопреломляющие среды и хранить в коробках, предупреждая попадание пыли. Гистологические препараты с часто встречающимися патологическими процессами по истечении 1 года «размываются». В последние годы медицинские фирмы выпускают специальное оборудование для архивирования гистологических материалов. Так, например, компания БиоВитрум выпускает шкафы-архивы вместимостью 99000 стекол. Стекла в таких шкафах помещаются в закрытые ящики в вертикальном положении в небольшие ячейки пластиковых вкладышей-разделителей.

1.3. Лабораторные инструменты и посуда

Количество и ассортимент лабораторной посуды и инструментов должен соответствовать объему обрабатываемого материала и разнообразию применяемых методов исследования.

Традиционный набор предполагает использование предметных и покровных стекол, химических стаканчиков, банок

с притертыми или «твист»-крышками, чашек Петри, воронок, колб и другой посуды. Для хранения гистологического материала требуются банки, лучше с широким горлом и притертой пробкой. Для дистиллированной воды обычно используют бутылки Вульфа, имеющие сливное отверстие в нижней части. При



отсутствии такой емкости можно использовать банку с пробкой, в которую вставлены две трубки – для слива воды и притока воздуха.

Так как при изготовлении препаратов часто используют токсичные, легко испаряющиеся жидкости (ксилол, толуол, эфир, хлороформ), то для их хранения необходимы небольшие емкости с притертыми крышками.

Очень удобны при изготовлении препаратов бюксы и кюветы. Бюксы – это низкие круглые стаканчики небольшого объема (10-50 мл) с притертыми крышками. Кюветы – прямоугольные стаканчики, обычно используются для одновременного окрашивания нескольких предметных стекол с наклеенными срезами. Для окрашивания гистологических препаратов используются емкости Лавелан-Менсила, Коплина, Шиффердекера, Хеллендахеля. Они отличаются между собой формой, а также количеством стекол, которые в них помещаются. В последнее время кроме стеклянной лабораторной посуды используются емкости из специальных полимеров, обладающих устойчивостью к различным химическим агентам. Благодаря наличию у них завинчивающихся крышек обеспечивается герметичность закупорки биологического материала. Следует учитывать, что бюксы, кюветы, биологические стаканчики, банки и другие емкости часто взаимозаменяемы, поэтому лаборант сам, исходя из возможностей и собственных привычек, подбирает себе их набор.

Обязательный набор посуды предполагает наличие мерных цилиндров различной емкости, стеклянных воронок, простых и градуированных пипеток, стеклянных палочек.

Покровные стекла – это пластинки из стекла толщиной 0,15-0,2 мм, размер которых подбирается соответственно площади, занимаемой срезом на предметном стекле.

Предметные стекла – это пластинки из стекла, толщиной 1-2 мм, размером 76x26 мм, на которые помещаются срезы исследуемых образцов. Иногда край стекла шлифуют, что облегчает маркировку препаратов. Шлифованное (матовое) поле предназначено для маркировки стекла простым карандашом. Для повторного использования надпись удаляют стирательной

резинкой или кипячением в мыльном растворе. Предметные стекла, поступающие в лаборатории с нанесенным фирменным адгезивным покрытием готовы к использованию для замороженных, формалин-фиксированных парафиновых срезов, цитологических мазков, культур клеток, срезов тканей, фиксированных различными смесями. Использование таких стекол значительно снижает потерю исследуемого материала вследствие отклеивания. Стекла СуперФрост Плюс (БиоВитрум) электростатически прикрепляют замороженные и фиксированные препараты и не имеют специального покрытия. Стекла СуперФрост Плюс Голд (БиоВитрум) предназначены для замороженных и фиксированных в формалине срезов, имеют матовое поле. Полилизиновые стекла (БиоВитрум) обработаны поли-L-лизинном. Histo Bond (БиоВитрум) обработаны силаном и предназначены для иммуногистохимических исследований. Histo Bond flu (БиоВитрум) обработаны силаном и имеют пониженный уровень собственной флуоресценции. Предметные стекла с окошками представляют собой стандартные стекла, на которые путем наплавления специальной краски при высокой температуре нанесено покрытие с окошками. Реакционное поле исследования, ограниченное размерами окошка, позволяет значительно снизить расход реагентов и стандартизировать методики. Покрытие не дает неспецифического флуоресцентного свечения, устойчиво к химическим и термическим воздействиям, имеет высокую гидрофобность, что позволяет удерживать жидкость в пределах окошка, выдерживает многократную обработку.

Для хранения и транспортировки стекол используют контейнеры и планшеты, изготовленные из полимерных материалов и рассчитанные на различное количество стекол. Пластиковые горизонтальные планшеты используются для ежедневной работы с микропрепаратами, они же могут применяться и в процедуре окраски.

Используемая в работе посуда должна содержаться в чистоте. Обычно посуду моют любым мыльным раствором или раствором, содержащим поверхностно-активные вещества, затем ополаскивают в нескольких порциях водопроводной и дис-

тиллированной воды. Современные тонкие методики исследования, в частности иммуноцитохимия, а также некоторые традиционные методики (например, импрегнация с использованием солей серебра), требуют большей чистоты посуды. В этом случае перед общепринятой обработкой мыльными растворами посуду выдерживают в 10-20% растворе бихромата калия в концентрированной серной кислоте. Такая обработка требует более тщательной промывки в водопроводной и дистиллированной воде. Лучше если посуда сушится после этого в сушильном шкафу.

Если предметные стекла используются повторно («размываются» препараты), то сначала снимаются покровные стекла. При нагревании препарата над пламенем горелки бальзам расплавляется, и покровное стекло легко сдвигается препаровальной иглой. Затем покровные и предметные стекла отдельно помещаются в емкость с любым имеющимся растворителем (ксилол, толуол). Если в качестве среды заключения использовался полистирол, то повторное использование стекол крайне затруднено. Из растворителя стекла переносятся в мыльный или содовый раствор, а затем многократно промываются в проточной воде. После этого их высушивают и обезжиривают в жидкости Никифорова (смесь 96% спирта с эфиром в соотношении 1:1) в течение нескольких дней. Из жидкости Никифорова стекла извлекают пинцетом, протирают сухой неволокнистой тканью (хлопчатобумажной или льняной). Если требуется обработка бихроматом калия в серной кислоте (при проведении некоторых гистохимических или иммуноцитохимических реакций), то обработку в жидкости Никифорова можно исключить. Критерием обезжиренности и чистоты является растекание капли воды, помещенной на его поверхность. На плохо промытом стекле вода собирается в округлые выпуклые капли.

В набор инструментов, используемых в практике лаборанта гистологической лаборатории, обычно входят различные зажимы, корнцанги, ножницы различных размеров, скальпели, лезвия. Часто стандартные лезвия безопасных бритв разламывают на 4 части, закрепляя каждую в зажиме. Таким образом готовят

импровизированные малотравматичные ножи, которые используются для иссечения мелких образцов ткани, например, для электронно-микроскопического исследования.

Необходимы анатомические (с нарезками на внутренней поверхности браншей) и хирургические (с крючками) пинцеты разного размера, металлические шпатели, металлические и стеклянные иглы. Стеклянные иглы легко изготавливаются из стеклянных палочек. Для этого достаточно нагреть палочку над открытым огнем и аккуратно растянуть ее в противоположные стороны.

Расходные материалы, необходимые для изготовления препаратов, кроме реактивов включают гистологические кассеты, биопсийные кассеты, биопсийные мешочки и прокладки, заливочные кольца, одноразовые микротомные ножи, фильтровальную бумагу, плотную бумагу для изготовления ванночек (при заливке образцов в парафин), карандаши для письма по стеклу или стеклорезы, если предметные стекла не шлифованы с одного из краев.

Набор посуды, инструментов и расходных материалов в каждом случае определяется объемом обрабатываемого материала и разнообразием используемых методов исследования, а так же материальными возможностями лаборатории.

Оснащение гистологических лабораторий включает также микроскопы, термостаты, микротомы, дистилляторы и бидистилляторы (требования, предъявляемые к качеству используемой в исследованиях воды, приведены в приложении 1), автоматы для гистологической обработки тканей, криостаты, магнитные мешалки, водяные бани, весы. Их устройство и правила работы на них мы будем рассматривать в разделах, где описываются процедуры, требующие наличия тех или иных приборов.

1.4. Правила техники безопасности при работе в гистологической лаборатории



Требования соблюдения техники безопасности, профилактики осложнений, контроля за состоянием здоровья персонала аналогичны тем, которые установлены МЗ РФ для работников клиничко-диагностических лабораторий.

Обязательность выполнения правил техники безопасности в гистологической лаборатории обусловлена тем, что на небольших площадях обычно концентрированно располагаются ядовитые, сильнодействующие, едкие, взрыво- и огнеопасные вещества, электронагревательные приборы, приборы, оснащенные острыми деталями, дорогостоящая аппаратура.

Работы в лаборатории должны проводиться в соответствии с правилами добротной лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP), принятыми в других странах. В России на их основе также были разработаны нормативные документы.¹

В лаборатории запрещается: хранить и принимать пищу, курить. Запрещается работать с едкими, сильнодействующими или ядовитыми веществами без включенного вытяжного шкафа.

¹«Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)»: Приказ министерства медицинской промышленности СССР за №154 от 17.05.91, ЗВ 64-126-91.

Санитарные правила и нормы. 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов в лечебно-профилактических учреждениях».

Правила техники безопасности при эксплуатации изделий медицинской техники в учреждениях здравоохранения. – М.: МЗ СССР, 1985.

Приказ МЗ РФ от 29.04.1997, №126 «Об организации работы по охране труда в органах управления, учреждениях, организациях и на предприятиях системы Министерства здравоохранения Российской Федерации».

«Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения». – М.: МЗ СССР, от 18.05.1979.

Нельзя использовать реактивы, не имеющие маркировки, пробовать их на вкус или вдыхать. Нельзя использовать реактивы с истекшим сроком хранения.

Токсичные, сильнодействующие, легковоспламеняющиеся вещества необходимо хранить в емкостях с притертыми или плотно закрывающимися крышками, или пробками из некоррозийных материалов, которые сверху заливают парафином. Запас таких реактивов хранят в отдельной комнате в закрывающихся металлических шкафах, удаленных от источников тепла и электрических приборов. Причем огне- и взрывоопасные вещества нельзя хранить совместно с концентрированными кислотами и щелочами. Для того чтобы предотвратить ненужные контакты с такими веществами, их местоположение (включая номер шкафов, полки, порядковый номер), количество, срок годности должны быть занесены в соответствующие журналы.

Расфасовку таких веществ, а также работу с ними можно производить только в вытяжном шкафу при работающей вентиляции. Отходы токсичных веществ собирают только в специально отведенную, герметично упакованную тару, которую, по мере наполнения, сдают для утилизации. Не допускается слив отходов в канализацию.

Следует учитывать так же, что обрабатываемый материал может быть инфицирован. При этом возникает опасность, как распространения заболевания, так и заражения персонала. В таких случаях, все гистологические исследования должны проводиться в отделениях, оборудованных по правилам вирусологических лабораторий.

Обязательным условием является унификация и специализация всех процедур. Весь персонал должен работать по единым стандартам и протоколам исследований. Целесообразно, чтобы все сотрудники имели навыки всех базовых методик, которые проводятся в лаборатории. Однако, многие фундаментальные и экспериментальные работы требуют индивидуального, нестандартного подхода. Их проведение чрезвычайно сложно, возможно возникновение разнообразных артефактов, в связи с чем такие опыты необходимо тщательно прорабатывать, дублиро-

вать, полученные результаты перепроверять в других режимах и на других моделях.

При работе с приборами и оборудованием следует придерживаться следующих правил:

- необходимо разместить все оборудование таким образом, чтобы обеспечить свободный доступ для его осмотра, технического обслуживания, безопасности работы;

- эксплуатации приборов и оборудования должен предшествовать контроль службы метрологии. Заключение о технической исправности должно храниться в лаборатории;

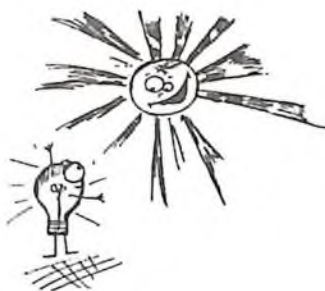
- в случае проведения внепланового ремонта приборов и оборудования необходимо сделать запись о характере неисправности и ее устранении;

- исполнители должны быть ознакомлены с правилами работы на приборах, оборудовании, правилами техники безопасности;

- порядок контроля метрологической службы за технической исправностью приборов и оборудования должен быть плановым и оформлен надлежащим образом.

Общепринятые правила противопожарной безопасности требуют наличия в доступном месте средств пожаротушения (огнетушители, асбестовые полотна, сухой песок).

Для ознакомления с правилами работы, не реже одного раза в год, каждый сотрудник должен проходить соответствующий инструктаж и только после этого получать допуск к работе.



ГЛАВА 2

ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ ОСНОВНЫХ ТИПОВ СВЕТОВЫХ МИКРОСКОПОВ ВОЗМОЖНОСТИ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

На сегодняшний момент, несмотря на технический прогресс, наиболее совершенной системой обработки изображений, остается человеческий глаз и анализирующий поступающие от него импульсы мозг. Все реализованные в настоящее время технические решения оптических приборов созданы по аналогии органа зрения, но не могут сравниться с ним по скорости реакции и разрешающей способности.

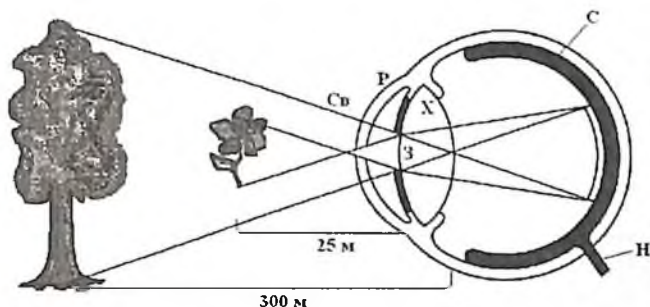


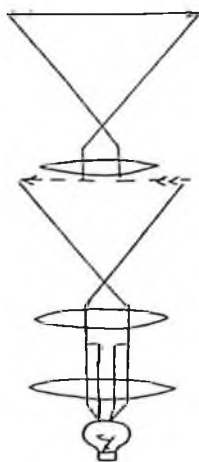
Рис.1. Принцип функционирования глаза человека.

*Св – световой поток, Р – роговица, З – зрачок, Х – хрусталик,
С – сетчатка, Н – зрительный нерв.*

Принцип функционирования глаза состоит в том (рис. 1), что световой поток (Св) первоначально попадает на изогнутую поверхность прозрачной роговицы (Р). В зависимости от интенсивности светового потока изменяется диаметр зрачка (З) – отверстия в радужной оболочке. Резкость изображения обеспечивается изменением кривизны хрусталика (Х), фокусное расстояние которого адаптируется благодаря цилиарной мышце таким

образом, что фокусировка может производиться на любой объект, находящийся на расстоянии от 20 см до бесконечности. Изображение регистрируется на сетчатке (С) фоторецепторными клетками – палочками и колбочками и преобразуется в энергию нервных импульсов, которые передаются по волокнам зрительного нерва (Н) к мозгу.

На рис. 1 показан ход световых лучей от цветка, расположенного на расстоянии 25 см от глаза и дерева, расположенного на отдалении 300 м. Исследование устройства органов и тканей предполагает наблюдение мельчайших структур. Однако если мы пытаемся рассмотреть тычинки у цветка или муравья на дереве, то их изображение создаёт пренебрежительно малый угол и не позволяет нам рассмотреть мелкие детали. «Собирающая» линза, расположенная между глазом и предметом, позволит увидеть



Г увеличенное изображение. Однако получить увеличение большее 8- или 10-кратных посредством отдельной линзы невозможно.

Если увеличение, полученное одной линзой, оказывается недостаточным, то можно ввести последовательно несколько линз. Это приводит к умножению кратности увеличения и позволяет достигать 200-кратных увеличений. Классический световой микроскоп осуществляет увеличение двумя шагами: объектив отображает увеличенное изображение предмета в так называемой промежуточной плоскости, а окуляр, в свою очередь, увеличивает промежуточное изображение. Как показано на рисунке 2, луч от источника видимого света (И) проходя через линзу конденсора (К), собирается в плоскости исследуемого объекта (О). Проходя через срез, свет преломляется объективом (Об), дающим увеличение изображения

Рис.2. Принцип работы основных типов световых микроскопов (по Крстич Р.В., 2001).

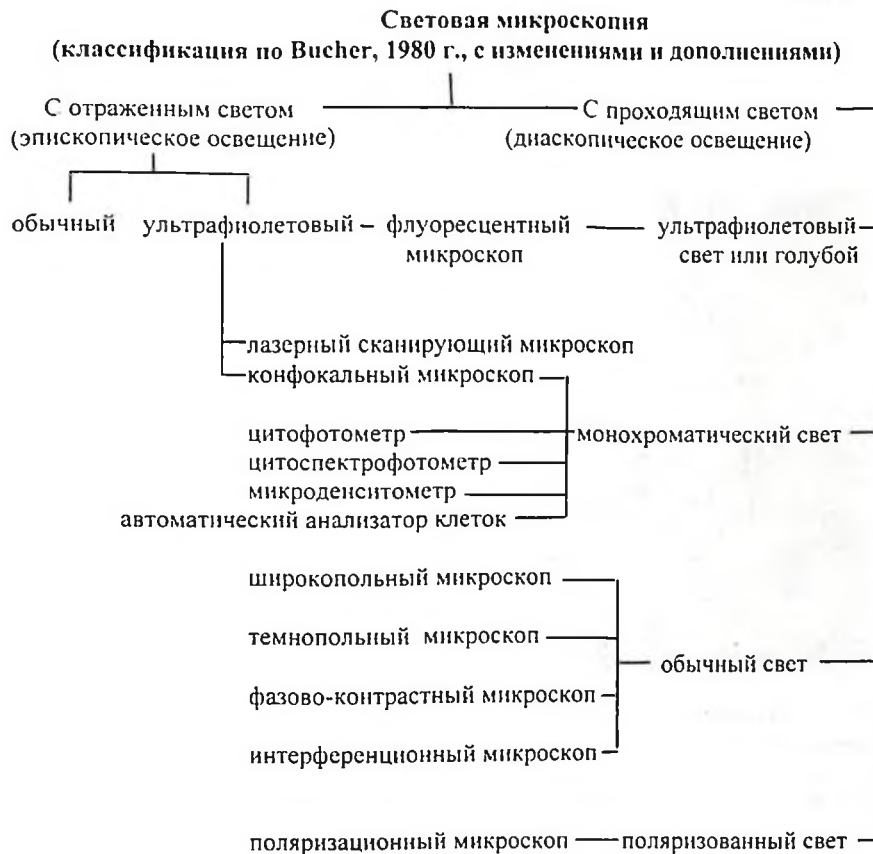
Г – глаз, Ок – окуляр, Об – объектив, О – объект, К – конденсор, И – источник видимого света.

объекта, после чего фрагмент изображения увеличивается окуляром (Ок) и улавливается глазом (Г) или фотокамерой.

Световые микроскопы – это большая группа микроскопов, использующих спектр видимого света (схема 1).

В настоящее время световой микроскоп является основным оптическим прибором практического патоморфолога. Разрешающая способность качественных световых микроскопов составляет около 0,25 мкм. Объединенные общим принципом работы, световые микроскопы подразделяются на группы, имеющие свои особенности. В связи с этим имеются некоторые отличия в технологии подготовки тканей к исследованию в различных типах микроскопов.

Схема 1



2.1. Широкопольная микроскопия

Широкопольная микроскопия – это наиболее часто употребляемая в практике патоморфологической лаборатории техника освещения диакопической (в проходящем свете) световой микроскопии. Поле наблюдения широко освещается с помощью конденсора. Свет проходит через препарат, формируя изображение, которое является результатом различного поглощения света участками окрашенного гистологического среза.

2.2. Темнопольная микроскопия

В основу темнопольной микроскопии положен способ диакопического (проходящего) освещения, при котором в объектив проходят не прямые лучи света, а пучки периферических лучей, которые формируются диафрагмой или специальным

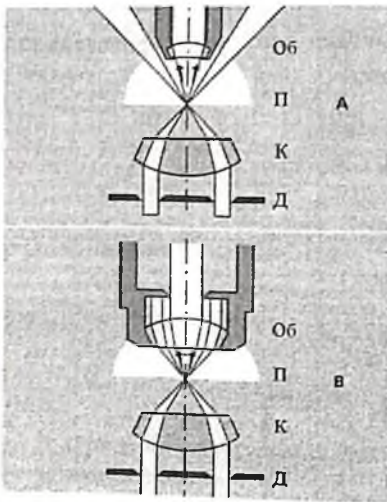


Рис.3. Принцип темнопольной микроскопии.

Д – кольцевая диафрагма, *К* – конденсор, *П* – препарат, *Об* – объектив.

темнопольным конденсором. Пучки лучей падают на препарат под косым углом, при этом объект исследования проявляется освещенным в темном поле. Для большей наглядности можно вспомнить, как выглядит паутина в осеннем лесу. Она практически не заметна на светлом фоне и как бы светится на фоне темного леса. В микроскопе (рис. 3, А) такой искусственный темный фон создается посредством кольцевой диафрагмы (Д) в конденсоре. Конденсорная оптика (К) хотя и освещает препарат (П), однако, полым конусом лучей. Свет не попадает на объектив (Об), а проходит снаружи.

Без препарата в таком случае в окулярах было бы совсем темно. Но если в плоскости предмета находятся объекты, маленькие частицы, например, бактерий, то свет отклоняется от своего прямолинейного пути (рис. 3, В). Этот световой поток, если он попадает в апертурный конус объектива, собирается объективом и объединяется в изображение: предмет становится видимым и ярко светится на темном фоне.

Темнопольная микроскопия позволяет исследовать мелкие и неокрашенные объекты, однако, она малоинформативна при изучении внутренней структуры объекта. В настоящее время темнопольная микроскопия применяется для изучения живых клеток или микроорганизмов. При гистологических исследованиях она чаще заменяется фазово-контрастной микроскопией.

2.3. Фазово-контрастная микроскопия

Фазово-контрастная микроскопия в проходящем свете как метод описана голландцем Фритсем Цернике в 1934 году. В современном варианте она является основным методом изучения культуры клеток и тканей, поскольку позволяет изучать живые клетки без их повреждения. Принцип метода можно разобрать на нескольких примерах.

1. Амплитуда (a) и фаза света, проходящего через прозрачный биологический объект (О), одинаковы до и после прохождения последнего и после (рис. 4.1).

2. Если объект задерживает свет (окрашенный срез, Окр) и имеет ту же толщину, что и в первом случае, то фаза света остается прежней, а амплитуда света после прохождения через объект уменьшается (a') (рис. 4.2)

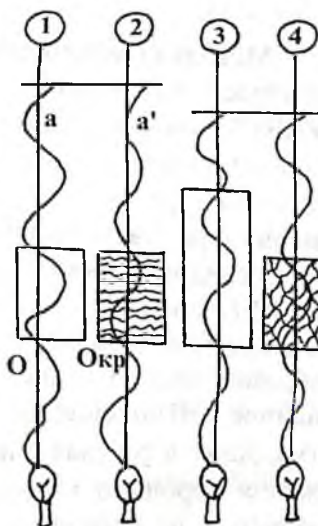
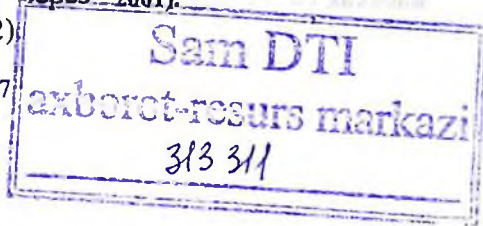


Рис.4 (1-4). Схема фазово-контрастной микроскопии (по Крстич Р. В., 2001).



3. Объект с теми же оптическими свойствами, что и в первом случае, но с большей толщиной, не меняет амплитуды, но уменьшает фазу (рис. 4.3).

4. Объект с индексом преломления, отличным от описанных в 1, 2 и 3-м случаях, не меняет амплитуды света, но уменьшает скорость прохождения света, что приводит к изменению фазы (рис. 4.4).

Объект в 1, 3 и 4-м случаях невидим, так как фоторецепторы глаза воспринимают лишь изменения амплитуды.

Тканевые и клеточные структуры вызывают изменения фазы, так как они имеют разную толщину и показатель преломления. Благодаря фазовой оптике колебания, фазы преобразуются в амплитудные колебания, что позволяет глазу различать все группы структур (1-4).

2.4. VAREL-контраст

Методика микроскопии, при которой смешиваются фазовый контраст и наклонное одностороннее освещение, называется VAREL-контраст. При этом со стороны освещения применяется дополнительная диафрагма в форме кольцевого сектора, дающего одностороннее наклонное освещение. Посредством перемещения в радиальном направлении извне внутрь, устанавливаются, последовательно друг за другом одностороннее темное поле, VAREL-контраст, как наложение фазового контраста и наклонного светлого поля и, наконец, наклонное светлое поле. Таким образом можно относительно недорого осуществлять прижизненное наблюдение за тканями и клетками в сосудах для культур. Даже в сосудах с изогнутым дном можно получать изображения хорошего качества. Фазовый контраст в таких случаях зачастую не проявляется, так как изогнутое дно действует как линза и ухудшает наложение фазовых колец. VAREL-контраст успешно применяется, если необходимо работать на живых клетках (микроманипуляция).

2.5. Интерференционная микроскопия

Так же, как и предыдущий вид световой микроскопии, используется для визуального количественного изучения нефиксированных живых клеток.

Принцип работы интерференционного микроскопа состоит в том, что пучок света расщепляется системой линз на две части. Одна часть проходит через препарат, другая – нет. После прохождения через два отдельных объектива составляющие пучка объединяются и интерферируют друг с другом. Измерение фазы интерференции (смещения пучков) позволяет с высокой точностью определять толщину и массу клеток или других изучаемых тканевых структур.

2.6. Поляризационная микроскопия

Поляризационная микроскопия использует световые волны, имеющие одинаковое направление колебаний, то есть «линейно поляризованный свет». Такой упорядоченный свет создается поляризаторами, фильтрующими из статистически хаотичных направлений колебаний в естественном свете одно преимущественное направление. Решающим является то, что два таких фильтра, введенных последовательно в ход лучей и повернутых на 90° относительно друг друга, не пропускают света. Первый из фильтров сортирует направления колебаний таким образом, что пропущенные им колебания как раз не могут пропускаться вторым фильтром. Второй фильтр называют «анализатором», так как с его помощью можно контролировать предпочтительное направление первого фильтра, называемого «поляризатором».

В микроскопе эта схема реализуется следующим образом (рис. 5): идущий от источника света (С) обычный свет поляризуется в поляризаторе (П), концентрируется конденсатором (К) в плоскости предметного столика (ПС), преломляется объективом (О), анализируется анализатором (А) и рассматривается через окуляр (Ок). Если призмы располагаются параллельно друг

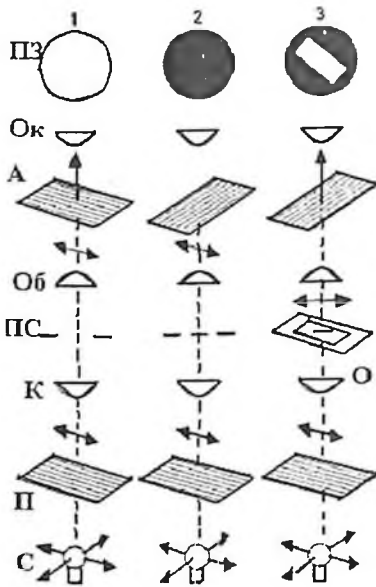


Рис.5 (1-3). Схема метода поляризационной микроскопии (по Крстич Р. В., 2001).

С – источник света, П – поляризатор, К – конденсор, ПС – предметный столик, О – объектив, А – анализатор, Ок – окуляр, ПЗ – поле зрения.

другу, поляризованный свет, проходящий через них и поле зрения (ПЗ), оказывается освещенным (рис.5.1). Если призмы пересекаются, то поляризованный свет не проходит и поле зрения остается темным (рис. 5.2).

Двойное лучепреломление (анизотропия) – способность некоторых структур, таких как коллагеновые волокна, поперечно-полосатые мышечные волокна, клеточные мембраны, миелиновые оболочки, расщеплять пучок поляризованного света на две составляющие, располагающиеся во взаимно перпендикулярных плоскостях. Если рассматривать такие структуры под поляризационным микроскопом между скрещенными поляризатором и анализатором, то в изображении наблюдается осветление, так как «повернутый» анализатором свет частично пропускается (рис. 5.3). Вращая предметный столик или анализатор, можно определить любое изменение в характере поляризации, вызываемое объектом, а, следовательно, и его структурную организацию. Анизотропия может быть усилена применением красителей, имеющих сродство к анизотропным структурам.

Использование в современных моделях поляризационных микроскопов вспомогательной лямбда-пластины позволяет преобразовывать контраст в цвет, что происходит вследствие разности хода поляризованного света в «двулучепреломляющем» материале пластины, и приводит к гашению определенных длин

волн в свете. Поэтому от белого света остаются лишь определенные цвета, формирующие цветное изображение.

Следует обратить внимание на то, что механические напряжения в стекле могут привести к двулучепреломлению, оказывающему воздействие на поляризованный свет. Как раз в силу этого для проведения количественных исследований в поляризованном свете в микроскопах используются конденсоры и объективы, не обладающие такими внутренними напряжениями. Эти объективы имеют специальную маркировку (в фирменной оптике Цейсс это красный символ «Pol»).

2.7. Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия – это световая микроскопия, в которой изучаемый объект освещается голубыми или ультрафиолетовыми лучами, чтобы вызвать флуоресценцию. Флуоресценция – это способность некоторых тканевых структур или красителей (флуорохромов) поглощать свет одной частоты, а излучать - другой. На практике, для экспозиции используется невидимая ультрафиолетовая часть спектра, которая возбуждает флуоресцентные вещества к излучению света видимой части спектра (рис. 6).

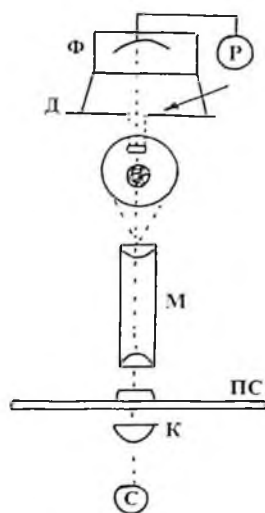


Рис.6. Схематический рисунок изменения частоты света при прохождении через структуры, содержащие флуоресцирующие вещества (по Крестич Р.В., 2001).

Флуоресцентные красители, используемые для окрашивания клеток и тканей и последующего исследования в флуоресцентном микроскопе, можно вводить прижизненно. Например, с помощью циклических антибиотиков, вводимых интракорпорально прижизненно можно изучать структуры кости, эмали, дентина, с помощью флуоресцеина – патологические изменения стромы роговицы. Флуорохромы можно наносить на приготовленные срезы, как, например, в иммуноцитохимии флуоресцентно окрашенные (меченые) антитела используют для выявления мест связывания антител с антигенами.

Принцип действия флуоресцентного микрофотографирования с использованием ультрафиолетовых лучей состоит в том, что свет сначала проходит через тепловой фильтр и фильтр, задерживающий все другие частоты, исключая ультрафиолетовые лучи. Флуоресцентное излучение, сформированное объектом, проходит через ультрафиолетовый фильтр, который задерживает ультрафиолетовую радиацию, защищает глаза и позволяет наблюдать все остальные цвета, излучаемые объектом.

2.8. Цитофотометрия



Цитофотометрия (гистофотометрия, микрофотометрия) - это методика полуколичественного анализа концентрации веществ в клетках или продуктах цитохимических реакций с использованием цитофотометра. Цитофотометр состоит из источника света (С), конденсора (К), предметного столика (ПС), микроскопа, фотометра (Ф) и регистрирующего устройства (Р)

Рис.7. Схема метода цитофотометрии (по Крстич Р. В., 2001).

С – источник света, К - конденсор, ПС – предметный столик, Ф – фотометр, Р – регистрирующее устройство, Д – диафрагма, О – отверстие в диафрагме, П - проекционное изображение.

(рис. 7). Изображение клетки или ткани в микроскопе проецируется (П) на измерительную диафрагму (Д) фотометра, который определяет степень поглощения света, проходящего через отверстие (О) в диафрагме.

Цитофотометр может предоставить относительные величины, полученные при сравнении окрашенных срезов или срезов после цитохимической реакции с необработанными срезами. В настоящее время предпочтительными считаются цитоспектрофотометры и микроденситометры.

2.9. Цитоспектрофотометрия

Цитоспектрофотометрия (микроспектрофотометрия) позволяет выявить и количественно анализировать различные типы химических соединений в клетках, основываясь на определении спектра поглощения с помощью цитоспектрофотометра. Цитоспектрофотометр состоит из источника света, монохроматора, способного пропускать свет определенной длины волны, конденсора, который фокусирует свет, проходящий через диафрагму в плоскости клетки, подлежащей анализу, микроскопа, фотоумножителя и регистрирующего устройства. Концентрация выявляемого вещества в заданной точке спроектированного изображения клетки измеряется с учетом максимума поглощения данного вещества при определенной длине волны. В комбинации со сканирующим устройством и компьютером цитоспектрофотометрия может служить как автоматический анализатор клеток.

2.10. Конфокальная и лазерная сканирующая микроскопия

Отличительной особенностью конфокального режима является использование точечного детектора, размер которого определяется конфокальной диаграммой, расположенной в конфокальной плоскости, оптически сопряженной с фокальной плоскостью объекта. Вследствие этого на фотодетектор попадет

только световое излучение от точек объекта, а излучение от точек, лежащих вне фокальной плоскости, практически не дает вклада в полезный сигнал.

Этот метод спектроскопирования может проводиться лишь на специальных конфокальных микроскопах. В конфокальном микроскопе параллельный световой пучок отображается объективом на изучаемый образец. В ходе лучей находятся сканеры, с помощью которых луч сканирует образец. Генерируемый на образце флуоресцентный свет снова возвращается через сканеры, что приводит к нейтрализации движения луча, затем отклоняется светоделителем и фокусируется на точечной диафрагме. За точечной диафрагмой флуоресцентный свет посредством запирающего фильтра отделяется от света возбуждения и постоянно измеряется световым детектором. Из таких замеренных значений компьютер «складывает» электронное изображение. Решающим фактором является то, что через точечную диафрагму в «пространственном фильтре» проходит только флуоресцентный свет из фокальной плоскости объектива. Свет от других плоскостей в препарате очень эффективно подавляется точечной диафрагмой. Это позволяет рассматривать отдельные плоскости препарата. С помощью компьютера создаются трехмерные изображения (3D-images).

Сочетая конфокальный лазер с AFM-микроскопом, работающим на основе атомных взаимодействий, можно получать изображение тканевых структур в диапазоне увеличений от 25х до 1000000х.

Применение системы лазеров, в том числе ультрафиолетового с соответствующим подбором фильтров, позволяет производить послойное сканирование тканевых структур по глубине. Лазерные сканирующие микроскопы приближают нас к разрешению, которое обеспечивается электронным микроскопом. Они могут работать как в режиме проходящего, так и в режиме отраженного света. Существуют их инвертированные модификации, которые позволяют изучать клетки в чашках Петри с электронномикроскопическим разрешением.

2.11. Микроскопия в отраженном свете

Исследователи, ставящие перед собой задачу изучения структур поверхностей, не могут получить требуемой информации при работе с микроскопом проходящего света. Для таких целей разработаны методики микроскопии отраженного света. Эти методики основаны на формировании изображения в отраженном от тканевых структур свете (рис. 8) (ОТ), как и при флуоресцентном микроскопировании, освещение препарата производится сверху через объектив. При этом в разных модификациях микроскопов для освещения (ОС) используются ультрафиолетовые, сине-фиолетовые (голубая флуоресценция) лучи или обычный свет.

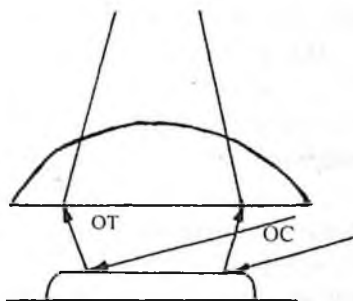


Рис.8. Схема попадания лучей в объектив светового микроскопа с отраженным светом (по Крстич Р. В., 2001).

ОС – источник освещения, ОТ – отраженный свет.

2.12. Атомно-силовая микроскопия

Принцип работы атомно-силового микроскопа позволяет с высоким разрешением исследовать практически любые поверхности, в том числе и не обладающие электропроводностью, что исключительно важно при изучении биологических объектов. Атомно-силовой микроскоп зондирует поверхность образца острой иглой, которая устанавливается на свободном конце подвижной измерительной консоли. В ходе сканирования острие движется вблизи исследуемой поверхности. Прибор регистрирует и поддерживает постоянными силы, действующие на острие со стороны образца. Диапазон этих сил составляет 10^{-11} – 10^{-6} N, что вполне сопоставимо с силами межмолекулярного взаимодействия и позволяет сканирующей игле выполнять роль

сверхчувствительного сенсорного механизма, не повреждая объект. Отклонения консоли анализируются и представляются в виде объемного изображения образца.

Важнейшим достоинством метода атомно-силовой микроскопии является то, что, используя его, можно с высоким разрешением изучать пространственную организацию мембранных поверхностей, макромолекул и других биологических объектов в их нативном состоянии. При этом возможно наблюдение за живыми клетками в их естественной среде, и одновременно – с нанометровым разрешением. Никакой дополнительной обработки поверхности образца при этом не требуется.

Одно из наиболее новых и перспективных направлений – использование принципа атомно-силовой микроскопии для исследования физических свойств клеточных мембран. Среди них такие важнейшие свойства, как эластичность, мобильность поверхностных слоев, адгезия, поверхностный заряд и некоторые другие. Атомно-силовая микроскопия позволяет также анализировать адгезивные свойства, которые определяют миграционную активность клеток, межклеточные взаимодействия и многие другие стороны клеточной жизнедеятельности. При этом успешно оперируют специфически модифицированными иглами, например покрытыми антителами.

Результаты сканирования позволяют получать объемные изображения объектов, подробную стереометрическую характеристику их формы, а кроме того, производить микроманипуляции с клетками и внутриклеточными структурами.

2.13. Автоматический анализ изображений

В основу метода инструментального компьютерного анализа клеток положена цитофотометрия (см. выше). В цитофотометре конденсор фокусирует пучок света в плоскости клетки, подлежащей анализу. Изображение клетки проецируется микроскопом на измерительную диафрагму фотоумножителя. Быстро-сканирующий прибор перемещает предметный столик микро-

скопа так, чтобы зонд сканировал всю поверхность клетки. Поглощение светового пучка кодируется и передается на компьютер. Описанная система позволяет, используя многопараметрический анализ, различать клетки, относящиеся к морфологически сходным клеточным популяциям, которые не могут быть идентифицированы визуально (ошибка менее 5%).

Отечественная фирма «ДиаМорф» на протяжении многих лет занимается разработкой и усовершенствованием систем анализа изображений. Так, например, предлагаемые этой фирмой аппаратно-программный комплекс «ДиаМорф» и автоматизированное рабочее место морфолога имеют широкий спектр применения в практической медицине и медико-биологических исследованиях. Такие системы позволяют автоматизировать клинкоморфологические исследования, в частности, осуществлять: вывод микроскопического изображения с помощью телевизионной или цифровой камеры на монитор компьютера, в том числе с накоплением и усреднением кадров, интерактивное редактирование изображения, автоматическую и полуавтоматическую идентификацию морфологических объектов, трехмерную реконструкцию морфологических структур, количественные и качественные измерения и оценку морфологических структур с графической визуализацией полученных данных, вывод данных измерения в реальных величинах, в зависимости от степени увеличения, создавать автоматизированные методики (например, подсчет числа митозов), осуществлять автоматизированные измерения более чем по 200 оптическим и морфологическим параметрам. Базы данных таких систем, совместимые с большинством известных баз данных, позволяют вести собственные базы данных гистологических препаратов и результатов исследований, автоматизировать регистрацию патологоанатомических исследований пациентов, имеют возможность создания базы данных эталонных гистологических препаратов для облегчения диагностики, позволяют хранить данные в электронном варианте. Кроме того, такие системы имеют возможности удаленных консультаций гистологических препаратов, проведения видеоконсилиумов.

2.14. Подготовка светового микроскопа к работе. Установка освещения по А. Кёллеру (рекомендации фирмы «Карл Цейс»)

Для подготовки микроскопа к работе в проходящем свете, наиболее часто используемом в повседневной практике гистологических лабораторий типа микроскопии, необходим препарат. Особенно хорошо подходят для этого тонкие окрашенные срезы. Полезным при этом может оказаться маленький кусочек малоформатного слайда размером 10x10 мм, расположенный плоско на препаратодителе с выравниванием посредством покровного стекла и уплотненный универсальным клеем. В качестве вспомогательного средства может использоваться также полоска тонкой белой бумаги размером около 3x10 см.

Рекомендуемая производителями микроскопов последовательность установки и юстировки состоит в следующем:

1. Для установки используется объектив 10x, в крайнем случае, 20x. Сначала необходимо ввести этот объектив в ход лучей (привинтить), проверить плотность завинчивания и правильно зафиксировать револьверную головку для объективов, в противном случае оптическая ось будет неправильной. С помощью фокусировочного привода обеспечить промежуточное пространство около 10 мм между поверхностью предметного столика и объективом.

2. Включить источник освещения и проверить, виден ли свет. Для этого разместить в опоре штатива над полевой диафрагмой полоску бумаги. Если всё остается темным, то следует проконтролировать сетевой штекер, осветитель и, может быть, предохранитель сетевого блока и при необходимости устранить неисправность. При отсутствии неполадок на бумаге видно световое пятно.

3. Открыть полевую диафрагму до упора: при этом световое пятно достигнет максимального диаметра.

4. Поместить полоску бумаги между препаратом и объективом. Полностью открыть апертурную диафрагму конденсора. При этом маленькое световое пятно на бумаге станет ярким.

При использовании конденсора с поворотной фронтальной линзой, она должна до упора вводиться в ход лучей.

5. Используя приводную ручку, установить высоту конденсора таким образом, чтобы фронтальная линза снизу была удалена примерно на 1-3мм от препарата. При этом нельзя прикасаться к препарату фронтальной линзой, также необходимо следить за тем, чтобы препарат не поднялся вместе с конденсором. В противном случае пружинный рычаг препаратоводителя может сбросить препарат с предметного столика. Современные микроскопы имеют регулируемый упорный винт, с помощью которого можно определить верхнюю позицию конденсора.

6. Проконтролировать, наблюдается ли в окулярах свет. Если изображение выглядит очень светлым, необходимо уменьшить яркость настолько, чтобы освещение воспринималось приятным. После этого можно установить на перемычке бинокулярного тубуса подходящее межзрачковое расстояние. Расстояние между зрачками считается правильным, если при наблюдении без напряжения вместо двух виден только один светящийся круг. Проверить, применяются ли окуляры с возможностью фокусировки (должна быть надпись: «*фоc*» или белая шкала). Если это так, то путем вращения установить «0». Исследователи, пользующиеся очками, сначала не должны их снимать. Как правило, окуляры современных микроскопов рассчитаны на операторов, работающих в очках. Поэтому выходной зрачок окуляра находится на некотором расстоянии позади окуляра. Микроскописты без очков должны выдерживать это расстояние, чтобы весь поток света из микроскопа попадал в ирисовую оболочку глаза. Если медленно перемещать голову перед окулярами вперед и назад, можно обнаружить, что имеется оптимальное положение, при котором можно удобно рассмотреть всё поле зрения. Микроскописты без очков могут пользоваться резиновыми раковинами на окулярах. Они не только эффективно защищают глаз от окружающего света, но и помогают выдерживать правильное расстояние между глазом и окуляром. Исследователи, работающие в очках с простыми сферическими линзами, могут микроскопировать как в очках, так и без них, если выравнивание диоптрий на окуляре

оказывается достаточным. Исследователи в очках с цилиндрическими стеклами – то есть такими, которые преломляют свет в поперечном направлении иначе, чем в продольном, должны микроскопировать не снимая очков.

7. При постоянном просмотре в окуляр осторожно перемещать посредством фокусирующего привода предметный столик вместе с препаратом вверх и вниз до максимальной резкости изображения. Однако, может оказаться, что резкое изображение ещё не будет получено, так как освещение не является оптимальным.

8. На следующем этапе производится установка освещения по Кёллеру. Для этого необходимо уменьшить полевую диафрагму и осторожно переместить вверх и вниз до тех пор, пока на краю не будет получено резкое изображение полевой диафрагмы или, по крайней мере, ее фрагмента. Если это сразу не получается, необходимо попробовать установить различные диаметры полевой диафрагмы и снова переместить конденсор, пока где-нибудь не будет виден фрагмент резко отображенного края диафрагмы. В большинстве случаев на такую процедуру поиска уходит определенное время.

9. Теперь микроскопическое изображение приобретает четкие контуры. Изображение полевой диафрагмы становится резким, но оно ещё не отцентрировано. Центровку можно провести с помощью центрирующих винтов на конденсоре. Если изображение полевой диафрагмы находится почти в центре, то необходимо поступить следующим образом: открыть полевую диафрагму до тех пор, пока она заполнит все поле зрения. Если при этом рассматривать край изображения, то должен быть виден небольшой темный край. Если этот черный край имеет одинаковое расстояние до края поля изображения, открыть полевую диафрагму до тех пор, пока ее край не выйдет за пределы поля зрения.

10. Далее регулируется контраст микроскопического изображения. Для этого необходимо уменьшить диаметр апертурной диафрагмы (первоначально она была полностью открыта). Апертурную диафрагму можно наблюдать в микроскопе, если вынуть окуляр из штуцера и смотреть непосредственно в тубус.

При этом глаз находится от штучера на расстоянии от 10 до 20 см. Далее нужно открыть и закрыть апертурную диафрагму в конденсоре, пока не появится четкое изображение в зрачке объектива. Затем установить примерно от $2/3$ до $4/5$ диаметра зрачка. При такой установке достигается почти полное разрешение и оптимальный контраст. Обычно в области разрешения идут на такой компромисс, потому что именно благодаря контрасту возникает пригодное для глаза изображение.

11. Окуляр возвращается на место. Микроскоп готов к освещению по Кёллеру – по крайней мере, для объектива, применяемого в данный момент. При переключении на другой объектив необходимо постоянно согласовывать апертурную и полевою диафрагмы. Однако, для установки апертурной диафрагмы не требуется постоянно вынимать окуляр. Если апертурная диафрагма отцентрирована для одного объектива, то вполне достаточно «подогнать» её для других. Для этого достаточно открыть апертурную диафрагму до упора и медленно закрыть ее до тех пор, пока изображение станет более темным и одновременно более контрастным.



ПОДГОТОВКА ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА К ИЗГОТОВЛЕНИЮ СРЕЗОВ ДЛЯ СВЕТООПТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Разнообразие применяемых в настоящее время морфологических методов исследования позволяет использовать их не только для посмертной постановки диагноза, но и, что более ценно и важно, для прижизненной диагностики большого числа патологических процессов. Причем часто морфологические исследования помогают не только уточнить предполагаемый диагноз, но и рассматривать патологический процесс в динамике, оценивать эффективность консервативного и необходимый объем оперативного вмешательства. Все это обуславливает высокую ответственность врача и лаборанта гистологической лаборатории, на которых возлагаются обязанности по проведению основных этапов изготовления гистологических препаратов.

Несмотря на большие технические возможности современной световой гистологии, большая часть практических исследований проводится с использованием широкопольных микроскопов проходящего света. Комплекс технических и технологических процедур при подготовке клеток, тканей или органов для таких светооптических исследований изложен в схеме 2 (по Р.В. Крстич, 2001). Ошибки, допущенные на любом из этапов, могут в дальнейшем значительно повлиять на правильность постановки диагноза.

Практика лаборанта гистологической лаборатории предполагает изготовление препаратов из органов и тканей, полученных разными путями. Это может быть биопсийный, операционный, трупный или экспериментальный материал.

**Подготовка гистологического материала
для светооптических исследований**



Ткани, используемые для изготовления препаратов, могут быть мягкими, твердыми или жидкими. Все это необходимо учитывать при проведении подготовительных к исследованию работ.

3.1. Взятие материала для гистологического исследования



При заборе материала для гистологического исследования необходимо соблюдать основные общие правила и вместе с тем учитывать особенности изучаемого органа.

Органы и ткани, из которых предполагается изготавливать препараты, должны быть по возможности свежими и сохранными. В противном случае, посмертные измене-

ния не позволят оценить реальную прижизненную ситуацию в органах и тканях. Препараты лучшего качества получаются из экспериментального, биопсийного и операционного материала.

Все другие правила забора материала, а в дальнейшем и проведения последующих этапов изготовления гистологического препарата, преследуют одну и ту же цель – максимально сохранить прижизненное состояние органов и тканей. Для предотвращения травматических изменений иссечение кусочков необходимо проводить острыми инструментами. Обычно для этого используют бритвы, секционные ножи. Движения, производимые такими инструментами должны быть «пилящими», исключая давление. При заборе пленочных образований (мозговые оболочки, сальник) или тонкостенных полых органов (кишечник, мочевой пузырь) можно воспользоваться малыми ножницами. Кусочки кости необходимо только выпиливать, так как использование для этих целей разнообразных щипцов неизбежно приведет к грубому сдавливанию тканей. Нельзя сдавливать кусочки, пытаясь очистить их поверхность. Забранные кусочки на инструменте, которым производилась вырезка, или анатомическим пинцетом переносят в фиксатор.

Иссекая кусочек, необходимо учитывать макро- и микроскопическое строение органа. Полые органы (кишечник, мочевой пузырь) исследуют на поперечных сечениях, включающих все оболочки. Из органов, имеющих однородное строение (печень,

селезенка), иссекают кусочки, включающие капсулу. Если орган имеет внутриорганные региональные особенности (например, корковое и мозговое вещество), то кусочек должен включать все слои. Если орган небольшой, можно забрать его целиком.

Если патологические изменения заметны при заборе, то иссекаемые кусочки должны включать и нормальные, и патологически измененные участки. Если патологический процесс (например, опухолевидное образование) захватывает большие площади, необходимо иссекать несколько кусочков из разных участков.

Не надо стремиться брать слишком большие кусочки. Всегда следует учитывать скорость проникновения в ткань выбранного фиксатора. Например, если фиксатор проникает в глубину ткани со скоростью 2 мм/ч, то структура, находящаяся на глубине 2 см начинает фиксироваться только через 10 часов, в течение которых в ней будут формироваться некротические изменения. Некоторые фиксаторы (например, осмиевая кислота) вообще не проникают глубже 1 мм. При общепринятой фиксации формалином обычно забирают кусочки размером 10x10x5 мм или пластинки необходимой площади толщиной 5 мм.

В связи с широким развитием прижизненных диагностических морфологических исследований встает вопрос и о минимальных размерах исследуемого кусочка. По пунктату диаметром 1 мм можно судить о природе патологического процесса, а если таких пунктатов или биоптатов из соседних участков несколько, то можно оценивать и распространенность процесса.

Некоторые органы и ткани после извлечения из тела требуют специальной подготовки к фиксации. Например, тонкостенные органы, серозные оболочки, пленки рыхлой соединительной ткани лучше фиксировать наколотыми на пробку в расправленном состоянии.

При взятии материала тонкой кишки необходимо сначала ограничить выбранный участок лигатурами, иссечь и перенести в физиологический раствор для предотвращения спастических сокращений гладкой мускулатуры. Затем, по возможности без ополаскивания, иссечь необходимые кусочки.

Участки дна желудка, пилорической части, перехода пищевода в желудок после забора так же сохраняют 1-2 часа в физиологическом растворе, дожидаясь прекращения непроизвольных мышечных сокращений. Если этого не сделать, то на препарате может сформироваться нехарактерное для прижизненного состояния расслоение слизистой оболочки.

Эндоскопические биоптаты органов пищеварения ввиду их малого размера заливают в один блок. Пособия по гистологической технике недавнего прошлого предлагали ориентировать биоптаты после забора в кусочке печени с разрезом (в «кармашке»). Такое расположение позволяет достоверно сопоставлять состояние структур, относящихся к различным отделам в пределах исследуемого органа. В настоящее время для обработки биопсийного материала используют биопсийные кассеты, мешочки и прокладки (см. главу 3.3). Поджелудочную железу и желчный пузырь рекомендуется забирать максимально быстро, так как ткани этих органов очень быстро подвергаются аутолизу. Образцы мышечной ткани после забора лучше «расслаблять» в физиологическом растворе и лишь затем фиксировать. При этом в поперечно-исчерченных мышцах лучше выявляется исчерченность, а в гладкой – уменьшается число волн сокращения. Органы центральной нервной системы забирают с использованием острых бритв.

В настоящее время в практику медицины все шире внедряются разнообразные экспериментальные методы исследования. Забор материала у экспериментальных животных производится чаще врачами-исследователями и лаборантами. Объем необходимого для исследования материала, сроки забора, определяет врач-исследователь в зависимости от целей и задач эксперимента.

Все работы, производимые с лабораторными животными регламентируются правилами, утвержденными Международной федерацией по защите животных и отраженных в санитарных правилах по оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник («Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник»), утверждены Главным Государственным санитарным врачом СССР от 06.04.73 г. № 1045-73).

Перед выведением из эксперимента животных не кормят 12-48 часов, жидкость не ограничивают. Холоднокровных животных (лягушек) умерщвляют методом декапитации. Для этого отсекают верхнюю челюсть с головным мозгом. Рефлекторные движения устраняют, разрушая спинной мозг длинной препаровальной иглой. После этого забирают необходимые ткани и органы.

Некоторые эксперименты допускают умерщвление передозировкой средств для ингаляционного наркоза. Для крыс лучше использовать эфир, для кошек – хлороформ. Наркотизацию можно проводить под колпаком, в эксикаторе или накладывая на морду животного тампон, смоченный выбранным анестетиком. Крупным животным после инъекции гексенала, тиопенталнатрия или их аналогов производят воздушную эмболию (кроликам в ушные вены, морским свинкам в полость сердца).

В настоящее время существует множество других вариантов вывода животных из эксперимента, которые подбираются исходя из целей и задач исследования.

Вскрытие лабораторных животных удобно проводить на металлических операционных столиках, операционных столах или небольших пенопластовых пластинках, в зависимости от величины животного.

Методика вскрытия практически одинакова для всех животных. Животное фиксируется марлевыми петлями за лапки в положении на спине. Шерстной покров в участке предполагаемого разреза выбривают или удаляют с использованием химической эпиляции. Нижнюю часть передней стенки живота приподнимают пинцетом по средней линии, разрезают до грудины, не задевая органов брюшной полости. Грудную полость вскрывают, отсекая грудину двумя параллельными разрезами через реберные хрящи.

Если эксперимент требует исследования нескольких органов, то порядок их извлечения следующий: тимус, легкие с внелегочными бронхами, сердце, органы брюшной полости, начиная с печени и селезенки, затем надпочечники, почки, мочевыводящие пути. Одновременно извлекают головной мозг. Для этого сначала снимают кожные покровы, затем кости черепа – кусачками у мелких животных, пилами или лобзиками – у крупных.

Иногда одновременно с забором материала начинают этап фиксации путем перфузии фиксирующего раствора. Перфузировать можно любой орган. Так, при необходимости зафиксировать головной мозг, перфузию проводят через восходящую часть дуги аорты. Фиксирующую смесь нагнетают под давлением 100-110 мм рт.ст. в течение 15 минут. После извлечения материал дофиксируют в том же растворе, который использовался для перфузии.

3.2. Принципы и методы фиксации гистологического материала



Очень ответственным этапом микроскопической техники является фиксация. Разнообразные методы фиксации преследуют одну цель – сохранить прижизненное состояние клеток и тканей. Достигается это путем быстрой коагуляции белков и стабилизацией липидов при взаимодействии тканей с фиксирующими жидкостями. Процессы клеточного метаболизма при этом прекращаются. Предотвращается аутолиз клеток и формирование посмертных изменений в тканях. Эта же цель может быть достигнута замораживанием с последующим изготовлением срезов на замораживающем микротоме.

Под влиянием фиксаторов тканевые структуры всегда деформируются. Они могут набухать или, чаще, сжиматься (до 40% от первоначально объема), уплотняться. Это в дальнейшем отражается на оценке состояния органа и постановке диагноза. В связи с этим надо тщательно, применительно к исследуемому органу и предполагаемой патологии, выбирать фиксирующую жидкость и режим фиксации.

Общие правила проведения этого этапа предполагают, что промежуток времени между иссечением образца органа или ткани и погружением его в фиксирующую жидкость, должен быть минимальным.

Увеличение этого промежутка может привести к подсыханию поверхностных слоев клеток, нарушению их структуры и формированию артефактов.

Объем фиксирующей жидкости должен превышать объем материала в 15-30 раз. Если одновременно фиксируется большое количество образцов, то желательно переслаивать их скомканными кусочками марли. Можно каждый образец завязывать в марлевый мешочек. Это позволяет фиксатору проникать внутрь равномерно, по всей поверхности кусочка. В последнее время для этих целей используют пластиковые гистологические кассеты, выпускаемые различными фирмами. Они имеют различную форму и размеры, поэтому подбираются в зависимости от размеров исследуемых образцов. Различная окраска крышек кассет позволяет легко ориентироваться при проводке нескольких образцов.

Если после погружения образцов фиксатор меняет окраску или мутнеет (из-за разбавления его тканевой жидкостью или кровью), то его необходимо срочно заменить свежей порцией. Не допускается повторное применение фиксирующей жидкости. Сроки фиксации различны и зависят от выбора фиксатора и условий фиксации. Например, общепринятая фиксация формалином при комнатной температуре обычно продолжается 1-2 суток. Время фиксации можно сократить повышением температуры фиксатора (до 37-40°C) или постоянным его перемешиванием (например, на магнитной мешалке).

В качестве фиксаторов используют простые жидкости (формалин, этиловый спирт, ацетон) и фиксирующие смеси (жидкость Карнуа, жидкость Ценкера).

Наиболее широко применяется недорогой фиксатор формалин (40% раствор формальдегида). Формалин легко диффундирует в ткани, применим для общих и для многих специальных и гистохимических методов окраски. Ткани можно не только фиксировать, но и хранить в растворах формалина. Критерием достаточной фиксации является равномерное уплотнение и обесцвечивание образца на контрольном разрезе.

Если материал переуплотнился в результате длительной фиксации, его можно размягчить, поместив в 10% раствор лимонной кислоты.

Одним из недостатков формалина является его склонность к осадкообразованию в крепких растворах, вследствие чего неконтролируемо снижается концентрация жидкости. Чаще это происходит при воздействии холода и света. Следовательно, чтобы избежать нежелательной полимеризации, формалин следует хранить в отапливаемом помещении в темноте. Если это невозможно, то образованный осадок можно растворить нагреванием раствора или его разведением горячей водой.

Перед употреблением формалин необходимо нейтрализовать. Для этого его настаивают на меле (CaCO_3) или углекислом основном магнезии ($3 \text{MgCO}_3 \times \text{Mg}(\text{OH})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$) из расчета 100 и более граммов нейтрализатора на 1 л неразведенного формалина. В этих же целях формалин можно разводить буферными растворами. Фиксация кислым формалином может отразиться на способности тканей воспринимать красители, приводить к образованию пигментных глыбок в цитоплазме и ядрах клеток.

До настоящего времени широко применяются рецепты изготовления формалиновых фиксирующих растворов, изложенных в классическом пособии Р.Лилли:

1) *10% формалин*

37-40% раствор формальдегида	100 мл
водопроводная вода	900 мл

2) *нейтральный 10% формалин*

37-40% раствор формальдегида	100 мл
дистиллированная вода	900 мл
карбонат кальция или магнезия в избытке	

3) *забуференный нейтральный раствор формальдегида*

37-40% раствор формальдегида	100 мл
дистиллированная вода	900 мл
однозамещенный фосфат натрия	4 г
безводный двузамещенный фосфат натрия	6,5 г

Кроме того, формальдегид используется при составлении сложных фиксирующих жидкостей.

В качестве фиксирующей жидкости можно применять 80-100% этиловый спирт (этанол). По сравнению с формалином спирт обладает меньшей проникающей способностью, но вызывает резкую коагуляцию белков. Температура фиксации жидкости $+4^{\circ}\text{C}$, но можно фиксировать материал и при комнатной температуре. Хранить кусочки в этаноле нежелательно, так как при этом они переуплотняются, пересушиваются. Фиксация этанолом предпочтительна при исследовании содержания и распределения в тканях гликогена, железа, амилоида. Поскольку этанол растворяет жиры, то предполагаемое выявление липидов делает фиксацию спиртом невозможной. Не следует использовать такую фиксацию и при исследовании слизистых, отечных тканей, так как спирт обладает обезвоживающим свойством. Рыхлые ткани при этом сильно сморщиваются, деформируются. Способность этанола обезвоживать ткани ускоряет проводку, при этом не теряется время на промывание и обезвоживание материала. Однако если материал не заливается в твердые среды, а нарезается на замораживающем микротоме, то спирт необходимо отмывать в течение нескольких часов проточной водой до полного погружения кусочков на дно сосуда (кусочки жировой и наполненной воздухом легочной ткани на дно не опускаются).

Для увеличения скорости фиксации, как, например, при обработке срочного биопсийного материала, в качестве фиксатора иногда используют ацетон, обезвоженный прокаленным сульфатом меди (медный купорос). Фиксация ацетоном при толщине кусочков 2-3 мм обычно продолжается 2 часа при комнатной температуре, 30 минут – при температуре 60°C (обязательно плотно закрывать посуду, так как ацетон летуч, токсичен, огнеопасен). Следует учитывать, что ацетон сильно уплотняет ткань, следовательно, так же, как и спиртовую, ацетоновую фиксацию не следует использовать для эмбриональных, слизистых, рыхлых тканей.

Для фиксации мазков крови и красного костного мозга лучше использовать метиловый спирт. Работа с метанолом ограничена его сильной отравляющей способностью и требует соблюдения правил работы, хранения и утилизации отработанных растворов.

Растворы глутарового альдегида, параформальдегида, тетраоксида осмия и другие, чаще используют при подготовке материала для электронно-микроскопического исследования. Более подробно они будут описаны в соответствующих разделах.

Поскольку каждый простой фиксатор имеет и преимущества, и недостатки, то лучших результатов можно добиться, составляя сложные фиксирующие жидкости.

Так, например, для гематологических и цитологических исследований применим Ценкер-формол. Для его приготовления первоначально готовят жидкость Мюллера, нагревая смесь 2,5 г бихромата калия, 1 г сульфата натрия и 100 мл дистиллированной воды. Затем добавляют 5 г сулемы и 10 мл 10% формалина. Продолжительность фиксации при температуре 37°C – около 6 часов, при комнатной температуре – до 24 часов. Промывка – 24-48 часов в проточной воде.

Сулема образует в тканях обильные кристаллические осадки, поэтому после промывания водой кусочки необходимо отмывать в 70% спирте, содержащем 10% настойку йода или спиртовый йодокалиевый раствор. Контроль проводят через 24 часа. Если раствор обесцветился, то процедуру повторяют. Дальнейшая проводка и заливка не имеют особенностей.

Жидкость Карнуа используется для большого количества гистологических гистохимических исследований, особенно ускоренных. Неприменима она только для выявления липидов. Для приготовления жидкости Карнуа 100% спирт, хлороформ, ледяная уксусная кислота смешиваются в соотношении 6:3:1 непосредственно перед применением. Фиксация продолжается 2-4 часа при +4°C или 1-2 часа при комнатной температуре. Промывка не требуется.

Для фиксации липидов используется кальций-формол по Бейкеру. 10 мл 40% формальдегида смешивают с 90 мл дистиллированной воды, затем добавляют 1 г хлорида кальция. Фиксируют материал при комнатной температуре 1-2 суток. Для этих же целей применима жидкость Чиаччо: 80 мл 5% бихромата калия, 20 мл формалина, 5 мл ледяной уксусной кислоты.

Ассортимент сложных фиксаторов очень велик. Выбор определяется целями и задачами исследований, выполняемыми в каждой конкретной гистологической лаборатории.

3.3. Подготовка материала к заливке в плотные среды (промывка, обезвоживание)

Подавляющее число гистологических методик требует изготовления прозрачных срезов, толщиной 3-5 мкм. Ушли в прошлое методики изготовления срезов острой бритвой вручную. Для этого используются специальные приборы – микротомы. Они позволяют получать быстро и относительно безопасно большое количество срезов заданной толщины. Кусочки ткани, из которых готовят срезы на микротоме, должны быть плотнее, чем свежая или фиксированная ткань. Уплотнить материал можно замораживанием или заливкой в плотные застывающие среды (парафин, воск, желатин, целлоидин).



Изготовление замороженных срезов не требует специальной подготовки материала. Резку можно начинать сразу после забора, что очень удобно для экспресс-диагностики, некоторых гистохимических, иммуногистохимических методик.

Однако метод замораживания имеет свои ограничения и недостатки. Практически невозможно резать на замораживающем микротоме рыхлые, распадающиеся ткани, жировую ткань, материал соскобов. Замороженные срезы имеют толщину не менее 10 мкм, в то время как образцы, залитые в плотные среды, могут подвергаться более тонкой нарезке (менее 60 нм при заливке в синтетические смолы). Замороженные срезы трудоемки в окрашивании, более ломкие. Учитывая это, заливка в плотные среды часто предпочтительна.

Так как большинство заливочных сред нерастворимы в воде, то материал необходимо предварительно обезводить и только после этого пропитывать и заливать в застывающие среды. Таким образом, подготовка к изготовлению тонких срезов предполагает предварительную промывку, обезвоживание, пропитывание и заливку материала в плотные среды.

Промывка материала

Большинство фиксирующих жидкостей образует в тканях разного рода осадки, кристаллы, что искажает прижизненную картину состояния органов и тканей. Для предупреждения формирования подобных артефактов материал промывают.

После формалиновой фиксации, использовании хромовых и сулемовых жидкостей материал промывают в проточной воде в течение 1-2 суток. Для этого необходимо поместить кусочки исследуемого материала в сосуд, емкостью не менее 0,5 л и обвязать его марлей для предупреждения утраты всплывающих в проточной воде образцов. При работе с биопсийным материалом мелкие кусочки можно укладывать в фарфоровые или металлические сита или стеклянные трубочки, завязанные с двух сторон марлей, и затем помещать их в общий сосуд. В арсенале современных гистологических лабораторий имеются гистологические кассеты, биопсийные кассеты, прокладки, мешочки. Гистологические кассеты изготавливаются из специального полимерного материала, обладающего устойчивостью к химическим реагентам. Они используются как для проводки, так и для заливки материала. Обмен жидкости в кассетах Турбофлоу (Цейсс) ускорен благодаря наличию не только верхних и нижних, но и боковых прорезей. Это обеспечивает более высокое качество обработки материала и экономию реагентов. Образцы, помещенные в такие кассеты, не теряются, благодаря крышкам с прорезями. Пластиковые кассеты выпускаются 3-х размеров: для стандартных образцов, для больших образцов, для эндоскопических биопсий. Кассеты выпускаются в 11 цветах, имеют металлические крышки для многократного использования или пластиковые – одноразовые.

Сулемовые осадки после промывки в проточной воде растворяют в 70% спирте, содержащим йодную настойку (см. главу «Фиксаторы»). Фиксаторы, содержащие пикриновую кислоту, требуют промывки материала в нескольких порциях 70% спирта. Некоторые фиксаторы (спирты, жидкость Карнуа) не требуют промывки.

Обезвоживание

Обезвоживание чаще всего проводят в спиртах восходящей концентрации, начиная с 50-70% (если фиксатор не содержал более концентрированный спирт и после него не проводилась промывка). Продолжительность этого этапа зависит от выбранной методики, качества материала, размера и количества обезвоживаемых кусочков. Количество используемого спирта зависит от размеров кусочков и от способа обезвоживания. Аппаратное обезвоживание требует большого количества спирта, проводимое вручную - меньшего. Сохранение способности раствора обезвоживать во многом зависит от аккуратности лаборанта. Каждый кусочек необходимо тщательно осушать фильтровальной бумагой при переносе из одного спирта в другой. Кроме того, спирты обладают жирорастворяющим свойством, поэтому ткани, богатые жирами и жироподобными веществами, быстро загрязняют растворы, снижают их обезвоживающую способность.

Для того чтобы проконтролировать степень загрязнения раствора, можно провести пробу с водой. Небольшое количество испытуемого спирта смешивают с водой. Если раствор при этом сильно мутнеет, то его необходимо заменить свежей порцией.

Неконтролируемое, неполное обезвоживание может привести к недостаточному пропитыванию заливочными средами (парафином, целлоидином) и в этой связи, трудностям при изготовлении срезов. При заливке в целлоидин, особенно богатых жирами образцов, плохое обезвоживание приводит к помутнению целлоидина. В среднем батарея спиртов, состоящая из банок емкостью 100-200 мл, способна полноценно обезвоживать и уплотнить 15-20 кусочков ткани.

Существует много схем обезвоживания, они отличаются количеством этапов повышения концентрации. Например, слизистые, богатые водой эмбриональные ткани, для избежания сильного сморщивания и пересушивания, лучше проводить через «длинные» батареи, в которых шаги повышения концентрации небольшие. Такие же схемы применимы и тогда, когда предполагаются тонкие цитологические исследования. Более плотные ткани не требуют этого. Батарея может быть сокращена до 2-3 спиртов.

Методики обезвоживания отличаются продолжительностью их проведения. Повышение температуры растворов спиртов до 37-40°C (в термостате) значительно ускоряет процесс обезвоживания. Одновременно усиливаются обезжиривающие свойства спиртов, что очень важно при проводке образцов, богатых жирами и жироподобными веществами.

Диффузионные процессы можно усиливать, постоянно перемешивая раствор (например, на магнитной мешалке). Скорость обезвоживания увеличивается и при использовании вместо спирта дистиллированного ацетона или ацетона с добавками силикагеля (для связывания остатков воды). Ускорить обезвоживание можно помещением образцов в 70% спирте в микроволновую печь на 20 секунд, а затем в абсолютный спирт на 30-40 минут.

Независимо от схем обезвоживания, растворы спиртов готовятся одинаково:

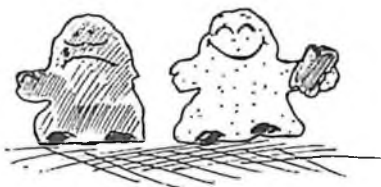
Требуемая концентрация спирта	40 %	45 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %
96 % спирт (мл)	42	47	52	63	73	83	94
H ₂ O (мл)	58	53	48	37	27	17	6

Можно использовать следующую формулу расчета. Число необходимой крепости спирта равно количеству миллилитров исходного 96% спирта. Затем к спирту добавляют воду до объема, соответствующего цифре крепости исходного спирта. На-

пример: для получения 50% спирта необходимо к 50 мл 96% спирта прибавить 46 ($96 - 50 = 46$) мл воды.

Абсолютный спирт готовят из 96-98%. Для этого предварительно прокаливают, периодически растирая, сульфат меди (медный купорос) до получения белого порошка. На дно банки высыпают 1 часть порошка и наливают 4-6 частей 96% спирта. Медный купорос при этом синее. Смесь выдерживают в течение 1-2 суток при частом встряхивании. Затем спирт сливают в другую банку, содержащую новую порцию безводной соли. Процедуру повторяют до тех пор, пока сульфат меди не перестает менять окраску (синеть).

3.4. Заливка материала в плотные среды



Степень уплотненности материала по окончании обезвоживания еще не позволяет изготавливать одинаковые тонкие (3-5 мкм) срезы. Поэтому следующим этапом приготовления гистологических

препаратов является заливка материала в плотные застывающие среды. Желатин, метакрилаты, полиэтиленгликоли растворимы в воде, но используются редко. Часто используемые парафины и целлоидин растворяются в органических растворителях, которые применяют в качестве промежуточной среды между обезвоживанием и заливкой.

3.4.1. Заливка в парафин (парафиновые среды)

Парафин - это плотная белая или светло-желтая масса, состоящая из смеси высокомолекулярных предельных углеводородов. Устойчив к действию кислот и щелочей. Растворяется в ксилоле, бензоле, толуоле, хлороформе, бутаноле, пропаноле и других органических растворителях. Большинство из них можно использовать в качестве промежуточной среды между спиртом и парафином. Различные виды парафина плавятся при темпера-

туре от 27 до 62°C. Парафины, имеющие температуру плавления ниже 50°C, называются мягкими, выше 50°C - твердыми. Для заливки чаще используются парафины с точкой плавления 48-56°C. Их можно получать смешиванием мягких и твердых парафинов. Для придания парафину эластичности в него добавляют пчелиный воск (до 5%). В настоящее время для этих целей используют синтетические пластические полимеры (например: диметилсульфоксид). Нужно учитывать, что пластические добавки часто повышают температуру плавления смеси. А при повышении температуры заливочной среды выше 60°C нередко происходит чрезмерное сморщивание ткани, что в дальнейшем отражается на качестве гистологических препаратов.

Такие сорта парафиновых смесей, как «Парапласт», «Парапласт плюс», «Гистозес», «Гистопласт», «Гистовакс» и другие аморфные разновидности парафина не требуют специальной подготовки. Кристаллические парафины перед употреблением необходимо гомогенизировать повторным сильным нагреванием с последующим быстрым охлаждением. Это придает парафину аморфность, большую пластичность и облегчает последующее изготовление срезов.

Часто используемая в последние годы гомогенизированная парафиновая среда «Гистомикс», является готовым продуктом, который содержит в своем составе натуральный воск и синтетические полимерные добавки. Точкой плавления является 52°C. «Гистомикс» не требует дополнительной фильтрации и гомогенизации, а также добавления каких-либо модифицирующих веществ. Эта смесь качественно депарафинизируется, что позволяет сохранить морфологическую и антигенную структуру ткани. Это особенно актуально при проведении иммуногистохимических исследований. Немаловажно и то, что «Гистомикс» адаптирован для использования в автоматических системах проводки и заливки. В тех случаях, когда к качеству срезов предъявляются повышенные требования, необходимо получить срезы мягких и плотных тканей толщиной до 2 мкм без деформации, можно использовать заливочную среду «Гистомикс»®EXTRA. «Гистомикс»®EXTRA дает возможность получать более плот-

ные блоки, это особенно актуально при работе в условиях температуры окружающей среды 25-26°C. Для этих же целей используется и добавка к заливочным средам отечественного и импортного производства «Гистомикс»®FLEX. Она содержит высокое количество полимеров, высокомолекулярных углеводов, пчелиного воска и компонентов на основе природного каучука и добавляется к основной парафиновой заливочной среде в количестве от 1 до 10% в зависимости от исходного материала и требуемых свойств.

Одновременно лучше проводить кусочки одинакового размера и по возможности одинаковой плотности. Образцы меньших размеров или кусочки рыхлых, мягких тканей проводятся быстрее.

Органические растворители, использующиеся для заливки, как правило, взаимозаменяемы. Лучшего качества препараты получают при использовании бензола, но его применение ограничено большей, по сравнению с другими растворителями, токсичностью. При использовании ксилола необходимо контролировать заливку. Критерием законченности пропитывания при этом является просветление кусочков. При дальнейшем воздействии ксилол сильно высушивает и деформирует ткани. Хлороформ не обладает такими погрешностями, поэтому в нем кусочки можно оставлять до 48 часов, не опасаясь деформации тканей.

Для постепенного пропитывания парафином кусочки переносят в смесь растворителя с парафином в соотношении 1:1. При комнатной температуре эта смесь ("каша") имеет вид мази, плавится при температуре 30-35°C, поэтому пропитывание проводят в термостате. Вне работы "кашу" лучше хранить при комнатной температуре.

Далее приводится несколько схем обезвоживания и заливки в парафин, различающихся временными интервалами, используемыми растворителями, способом проводки. Выбор методики зависит от целей и задач исследования.

Обезвоживание и заливка по Ромейсу

Спирт 50% - 2 часа, 70% - 3 часа, 96% - 4 часа, 100% - 1-2 часа, метилбензоат I - 2 часа, метилбензоат II - 2 часа, бензол- 2 часа, бензол + парафин (1:1) - 1 час, парафин при 60°C - 8 часов.

Обезвоживание и заливка с использованием изопротилового спирта

Изопропиловый спирт 50% - 2 часа, 75% - 3 часа, 90% - 6 часов, 100% I - 4 часа, 100% II - 4 часа, изопропиловый спирт + парафин (1:1) при 60°C - 12 часов, парафин при 60°C - 8 часов.

Обезвоживание и заливка по Волковой-Елецкому

Спирт 50% - 4 часа, 60% - 4 часа, 70% - 24 часа, 96% I - 12 часов, 96% II - 12 часов, 100% I - до 12 часов, 100% II - 12 часов, спирт 100% в смеси с хлороформом (1:1) - 3 часа, хлороформ I - 1 час, хлороформ II - 30 минут, хлороформ III - 30 минут, хлороформ + парафин (1:1) при 37°C - до 6 часов, хлороформ + парафин (1:1) при 56°C - 1 час, парафин I при 50°C и парафин I при 56°C - по 2 часа, парафин III при 56°C - 1 час.

Схема заливки с использованием автомата

Спирт 70% I, II - по 2 часа, спирт 96% I, II - по 1 часу, спирт 100% I, II, III - по 1 часу, растворитель (бензол, ксилол, толуол) I, II - по 1 часу, парафин (парапласт) I при 60°C - 2 часа, парафин (парапласт) II при 60°C - 3 часа.

Схема заливки

с использованием магнитной мешалки

Спирта 50%, 60% - по 20 минут, спирт 70% - 1 час, спирт 80%, 90%, 96% I, II, III - по 20 минут, спирт 100% - 2 часа. Далее без мешалки. Бензол, ксилол или другой растворитель - по 2 минуты, 200 мл бензола и твердый парафин до насыщения при 37°C - 20 минут, парафин I, II, III - по 20 минут при 60°C, парафин IV - 1 час при 60°C.

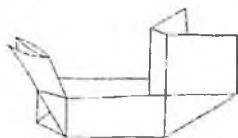
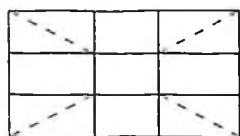


Рис.9. Изготовление бумажной формочки для заливки материала в парафин.

Заливка биопсийного материала с использованием автомата

Ацетон I, II, III, IV – по 30 минут, ацетон + ксилол (1:1) – 10 минут, ксилол – 10 минут, парафин (парапласт плюс) при 60°C – 30 минут.

По окончании пропитывания и последующего освобождения от растворителей в нескольких порциях парафина необходимо уложить кусочки в специальные формочки и залить новой порцией парафина. В качестве формочек можно использовать сложенные из бумаги коробочки необходимого размера (рис.9), фабрично изготавливаемые металлические или пластмассовые формы, стеклянные чашечки.

Кусочки из второго парафина при открытой дверце термостата переносятся теплым анатомическим пинцетом в формочки. Если в формочку укладывается несколько кусочков, то между ними оставляют промежутки, достаточные для формирования в дальнейшем отдельных блоков для каждого кусочка. Заливают новой порцией парафина, чтобы высота слоя парафина над кусочками была не менее 5 мм. Это делается потому, что при застывании парафина в центре формочки образуется кратерообразное углубление, кусочки ткани при этом могут оголяться, их невозможно монтировать на деревянные бруски.

Парафин, извлекаемый из термостата, быстро застывает, становится затруднительной правильная ориентация кусочков. В формочку проникают пузырьки воздуха. Поэтому, если одновременно заливают большое количество кусочков, то зону, где проводится заливка желательно по-

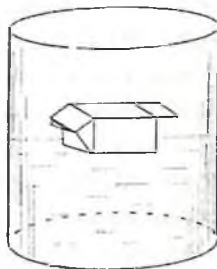


Рис.10. Быстрое охлаждение формочек с залитым в парафин материалом на поверхности холодной воды.

догревать (например, тепловентилятором). Если это сделать невозможно, и парафин в формочках застывает до окончания ориентации кусочков, то можно его снова расплавить кратковременным помещением в термостат, затем доориентировать кусочки, промаркировать формочки и охладить.

Охлаждение форм лучше проводить холодной водой (бумажные формочки плавают на поверхности), не допуская попадания воды на парафин (рис.10). Чем быстрее проводится охлаждение (желательно только с нижних и боковых поверхностей), тем более однородным становится парафин, что облегчает в дальнейшем изготовление срезов.

После окончательного застывания, парафин с кусочками ткани извлекают из формочки. Если извлеченный блок неоднороден, содержит белые крошковатые участки или пузырьки воздуха, то его лучше перезалить в новую порцию парафина. Качественно залитые, однородные блоки формируют, обрезая скальпелем или горячим шпателем излишки парафина. Блок должен иметь четырехугольную форму, а между объектом и краями блока необходимо оставлять 1-2 мм парафина. Затем блоки приклеивают к деревянным брусочкам соответствующего размера. Для этого проводят по нижней поверхности блока горячим шпателем и моментально прижимают блок к кубику. Для большей прочности сцепления, по вертикальным поверхностям блока тоже проводят горячим шпателем (необходимо помнить об обязательной маркировке блоков). В таком виде материал готов для резки на микротоме. При заливке можно использовать гистологические кассеты, тогда они будут служить основанием для блоков, необходимость использования деревянных брусочков при этом отпадает. Компания БиоВитрум предлагает использовать заливочные пластмассовые кольца. Они вкладываются в заливочные формы в момент формирования блока и в дальнейшем служат его основанием. При этом также отпадает необходимость приклеивать блок на деревянную основу.

Для стандартизации, ускорения и облегчения процедуры заливки образцов в парафин в настоящее время предлагаются спе-

циальные аппараты. Так, например, фирма Leica выпускает Гистотап плюс (Leica EG 1120) – диспенсер для заливки парафином гистологического материала в блоки. Вместимость аппарата 3,75 л парафина. Цифровая индикация на дисплее отражает температуру в емкости для расплавления парафина и нагревательной плате (до 70°C).

Как дополнительный модуль к парафиновому диспенсеру используется охлаждающая плата – Гистоблок (Leica EG 1130). На ее поверхность может быть установлено до 60 блоков. Охлаждение регулируется до -15°C. Этой же фирмой выпускается Гистоэмбеддер (Leica EG 1160) или станция заливки парафином. Гистоэмбеддер состоит из подогреваемых отсеков для ванночек и кассет, диспенсера парафина с подогреваемым столиком, подогреваемого держателя для пинцетов, охлаждаемого столика на 60 блоков и люминесцентного осветителя. Аппарат допускает независимое программирование температурных режимов всех блоков.

3.4.2. Заливка в целлоидин

В современной практике заливка в целлоидин используется реже, чем в парафин. Ее применяют в том случае, если предполагаемые методы исследования исключают возможность воздействия на ткани высоких температур. Заливка в целлоидин удобна при изготовлении срезов из труднорежущихся тканей, органов имеющих полости или лакуны (например, глазное яблоко), образцов, имеющих перемежающуюся консистенцию. Заливка в целлоидин позволяет изготавливать срезы большой площади и толщины. Такую заливку часто используют при исследовании органов нервной системы. Недостатками целлоидиновой заливки является ее длительность, необходимость сохранять залитый материал в спирте, трудности при изготовлении тонких срезов.

Целлоидин - это термопластический материал, состоящий из мононитроцеллюлозы, динитроцеллюлозы и камфоры. Выпускается в виде белого ватоподобного вещества или в виде пластинок. Хорошо растворяется в эфире и смеси эфира со спиртом. Если

используется целлоидин уже вскрытый, незапаянный герметично, то его перед использованием рекомендуется подсушить в термостате при 37-40°C. Следует учитывать, что сухой целлоидин огнеопасен. Примеси воды, попадающие в рабочие растворы целлоидина со спиртом и эфиром, могут вызвать их помутнение.

Рабочие 2-8% растворы целлоидина готовят следующим образом. Навеску сухого целлоидина заливают для набухания абсолютным (100%) спиртом на 1 сутки, затем для растворения добавляют столько же безводного эфира. Если целлоидин сразу залить смесью спирт - эфир (1:1), то растворение будет продолжаться несколько дней.

Схема обезжиривания и заливки в целлоидин

Спирты 96, 100% – по 24 часа. Спирт 100%: эфир (1:1) - до 24 часов. Этот этап можно сократить или исключить. Длительность его зависит от содержания в исследуемом материале жиров. При недостаточном обезжиривании целлоидин может помутнеть, это отразится на качестве изготовленных гистологических препаратов. Таким образом, чем больше в ткани жиров, тем длительнее и тщательнее проводится обезжиривание. Затем кусочки переносят последовательно в 2 и 4% целлоидин по 2 суток, в 8% целлоидин - на 5-8 суток. После этого кусочки раскладывают, ориентируют в чашках Петри, маркируют и заливают свежей порцией 8-16% целлоидина. Толщина целлоидина над кусочками должна быть не менее 1 см, так как при последующем уплотнении и высыхании целлоидина его уровень может снижаться более чем на 50%.

Чашки с целлоидином помещают в эксикатор или под колпак в пары хлороформа на 1-3 суток. За это время целлоидин уплотняется до консистенции мягкой резины, но остается прозрачным. Если заливка проводится во влажном помещении, то в эксикатор ставится стаканчик с серной кислотой, что позволяет избежать помутнения целлоидина.

После достаточного уплотнения кусочки вырезают из целлоидина, оставляя со всех сторон по 2-3 мм, подравнивают,

формируя блоки, приклеивают густым целлоидином к брускам и хранят в 70% спирте. Резать такие блоки рекомендуется не ранее, чем через 3 часа после наклеивания. При срочных исследованиях, для быстрого прикрепления к бруску, свежеприклеенные блоки помещают на 10-20 минут в хлороформ.

При хранении материала в спирте из деревянных брусков-основ – могут экстрагироваться красящие и дубильные вещества, неблагоприятно влияющие на способность целлоидина в дальнейшем воспринимать красители. При изготовлении целлоидиновых блоков необходимо использовать синтетические или подготовленные особым образом деревянные бруски.

При подготовке брусков их сначала вываривают в 2% растворе гидрокарбоната натрия в течение нескольких часов, затем выдерживают не менее месяца в 70% спирте, часто меняя раствор. Можно пропитать бруски целлоидином. Избежать такой длительной, трудоемкой подготовки можно хранением целлоидиновых блоков без кубиков. Блоки удобно нанизывать на нитку и прикреплять к ней маркировочную бирку.



ГЛАВА 4

ИЗГОТОВЛЕНИЕ СРЕЗОВ ДЛЯ СВЕТООПТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для изготовления тонких гистологических срезов заданной толщины в настоящее время используются специальные приборы – микротомы. Конструкции их разнообразны. По принципу работы выделяют санные, ротационные, дисковые, замораживающие микротомы, вибраторы, криостаты.

4.1. Устройство и принцип работы санных микротомов

Санные микротомы позволяют изготавливать срезы из тканей, залитых в парафин, целлоидин или другие плотные среды. Принцип работы санных микротомов заключается в том, что объект, помещенный на столике, перед каждым движением ножа автоматически поднимается на заданную высоту (толщину среза). Нож в таких микротоме движется по ножевым салазкам в горизонтальном направлении.

Основу корпуса санного микротоме составляет станина. Это металлическая пластина, закрепленная на неподвижном основании. На верхней горизонтальной поверхности станины продольно располагаются две или три шлифованные полосы (рельсы), по которым движется нож, закрепленный в ножевых санках. Боковые движения ножевых санок ограничены. Станина массивна или фиксируется к столу. Она обеспечивает устойчивость прибора при работе. На боковой поверхности станины располагаются шлифованные рельсы для движения объектных санок. Объектные санки движутся обычно по наклонной плоскости вверх, выдвигая при каждом движении ножа объект на заданное число микрометров.

Толщина среза, то есть степень подъема объектодержателя, определяется микровинтом. Микровинт движется в наклонной или вертикальной плоскостях и имеет вид металлического стержня. Он связан с градуированным приспособлением, каждое деление которого соответствует продвижению зубчатого колеса на один зубчик, и продвигает объектодержатель вверх на 1 мкм. Шкала делений позволяет задавать необходимую толщину среза. Ножевые санки имеют скользящие по станине поверхности и зажим для ножа. На боковой поверхности ножовые санки имеют рукоятку, которая позволяет продвигать их по станине. Зажимы для ножа могут иметь различную конструкцию, но всегда необходимы для закрепления ножа под определенным углом к объекту.

Современные санные микротомы имеют моторизированную систему подачи, систему ретракции, программируются, параметры настройки выводятся на цифровой дисплей. Выпускаются программируемые моторизированные санные микротомы для больших и особо твердых препаратов, системы фрезерования позволяют изготавливать срезы костей, зубной эмали, металлических штифтов в костях.

4.2. Устройство и принцип работы ротационных микротомов

Ротационные микротомы часто используются для изготовления серийных парафиновых срезов (С). В отличие от санных, в ротационных микротоме неподвижен закрепленный наклонно нож. Объектодержатель (О) с закрепленным блоком (Б) движется в вертикальной плоскости, наезжая на нож (Н) (рис. 11).

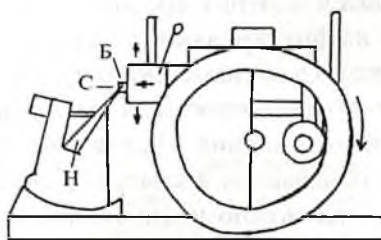


Рис.11. Устройство и принцип работы ротационного микротомов.

С – серийные парафиновые срезы, О – объектодержатель, Б – закрепленный блок, Н – нож.

В настоящее время выпускаются комбинированные модели микротомов, сочетающие линейное горизонтальное движение ручного привода (как в санном микротоме) при вертикальном перемещении образца.

4.3. Дисктовые микротомы

Принцип работы дисктового микротомы состоит в спиралевидном движении образца, зафиксированного на вращающемся диске. Такие микротомы сочетают высокое качество срезов санного микротомы с возможностью серийных срезов ротационного микротомы. Следует заметить, что в дисктовом микротоме используются только одноразовые ножи и образцы на кассетах.

4.4. Замораживающие микротомы

Замораживающие микротомы часто используются для изготовления срезов материала срочных биопсий при необходимости использования гистохимических, иммуноцитохимических методов исследования. Для резки на замораживающем микротоме уплотнение материала достигается замораживанием, поэтому заливка в плотные среды не требуется. Можно готовить также срезы из фиксированного, залитого в всдорастворимые среды материала. Особенностью замораживающих микротомов является то, что объектодержатель (замораживающий столик) снабжен системой охлаждения. Охлаждающим агентом может быть углекислота, подаваемая в камеру объектодержателя из баллона. Для охлаждения можно использовать и термоэлектрический эффект. При этом способе одна сторона столика охлаждается, а другая при пропускании постоянного тока через полупроводниковый элемент – нагревается. На замораживающую сторону помещается объект резки, противоположная сторона должна быть обеспечена системой охлаждения. Чаще, это проточная вода, подаваемая через систему шлангов. В связи с тем, что замораживание не обес-

печивает необходимую твердость при сохранности эластичности материала, на замораживающем микротоме практически невозможно получить срезы тоньше 10 мкм. Кроме того, в таких устройствах охлаждается только объектодержатель, нож при этом остается теплым. При попадании на него срезы оттаивают, легко сминаются. Становится трудоемкой их дальнейшая обработка. Этих недостатков лишены криостаты.

4.5. Криостаты, криокиты

Криостаты – это специальные охлаждающие камеры, способные поддерживать отрицательные температуры (до -65°C), снабженные микротомом, специальными отверстиями для рук или системой дистанционного управления, системой освещения и визуального наблюдения (окошечко). Низкие температуры, создаваемые в криостатах, позволяют готовить тонкие срезы из нефиксированного материала, что значительно расширяет возможности гистохимии, иммуноцитохимии. Низкотемпературный принцип изготовления гистологических срезов используется также в криокитах.

Независимо от конструкции прибора, используемого для изготовления гистологических срезов, он должен быть снабжен микротомным ножом.

4.6. Вибратомы

Основной принцип работы вибратома – обеспечение вибрации режущего лезвия в горизонтальной плоскости с частотой 50 Гц. Это позволяет готовить срезы из свежefиксированного, не залитого в плотные среды материала, что особенно важно при проведении иммуноцитохимических или срочных традиционных исследований. Разрешающая способность этого метода снижается тем, что вибратором часто не позволяет готовить срезы, толщиной менее 50 мкм. Кроме того, требуется достаточно «же-

сткая» фиксация, обеспечивающая минимальную плотность на-
резаемого кусочка. Качество срезов ухудшается по мере увели-
чения их площади. Избежать этих недостатков можно регулиро-
ванием амплитуды движения лезвия и скорости резания. С этой
же целью кусочки материала можно покрывать желатиновой
или агаровой оболочкой (Угрюмов М.В., 1991).

4.7. Микротомные ножи (классификация, правила использования, методы правки и заточки)

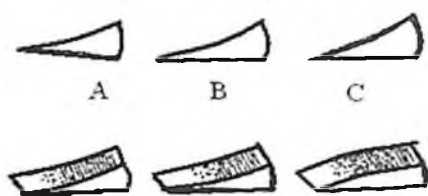


Рис.12. Микротомные ножи групп
А, В и С.

Чаще всего это сталь-
ные бритвы длиной от 8 до
50 см. По признаку длины
ножи условно подразделя-
ют на короткие (8-10 см),
малые (13 см), средние (17-
20 см) и большие (более 25
см). Поперечное сечение
ножа имеет вид клинка. В
зависимости от конфигурации лезвия различают ножи групп А,
В и С (рис.12).

Группа А – представлена плосковогнутыми ножами с боль-
шой кривизной вогнутой поверхности. Готовятся они из мягкой
стали, поэтому предназначены для изготовления срезов неболь-
шой площади материала, залитого в целлоидин.

Группа В – имеет меньшую кривизну вогнутой поверхно-
сти. Такие ножи готовятся из более твердой стали, используют-
ся чаще для резки целлоидиновых блоков любой величины.
Можно резать ими и парафиновые блоки, но ножи при этом бы-
стро тупятся, требуют частой заточки.

Группа С – ножи этой группы имеют плоские поверхности,
изготовлены из твердой стали, используются для резки матери-
ала, залитого в парафин или замороженного материала.

Продолжение широких поверхностей ножа формирует угол
лезвия (рис.13, $\angle BAC$). Для того, чтобы получать максимально

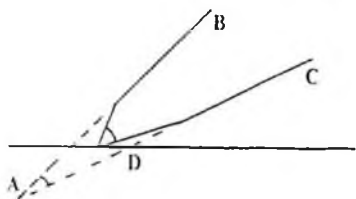


Рис.13. Угол лезвия ($\angle BAC$) и угол резания ($\angle BDC$) микротомного ножа.

тонкие срезы, ножи затачивают под немного большим углом – углом резания, при этом формируются плоскости заточек микротомного ножа – фасетки. Ширина фасеток определяет величину угла резания (рис.13, $\angle BDC$).

Чем шире фасетка, тем меньше угол резания. Меньший угол резания позволяет готовить более тонкие срезы. Величина фасетки хорошо наточенного ножа обычно не меньше 1,5-2 мм.

Правильность заточки и острота микротомного ножа во многом определяют качество получаемых срезов, а в некоторых исследованиях (иммуноцитохимические методики окраски) влияют на степень неспецифического окрашивания. Для сохранения ножей в рабочем состоянии необходимо соблюдать некоторые правила:

1. Перед каждым использованием ножа его следует править, по мере необходимости – точить;
2. Хранить нож в футляре, режущим краем вниз;
3. При длительном хранении смазывать нож вазелином или машинным маслом;
4. После работы насухо вытирать ножи;
5. Не прикасаться к режущему краю ножа, очищать поверхность мягкой тканью по направлению от спинки к режущему краю;
6. Не срезать лишней заливочный материал с верхней поверхности блока рабочим ножом; лучше это делать скальпелем, лезвием безопасной бритвы или вспомогательным ножом;
7. Если плотность материала неизвестна (при исследовании скелетных тканей, тканей зуба), степень декальцинации лучше проверять вспомогательным ножом.

Берегите нож – главное орудие лаборанта-гистолога!

Перед каждым использованием ножа необходимо оценить его качество. Для этого нож осторожно помещают на предмет-



Рис.14.
Ручка микротомного ножа.



Рис.15.
«Обушок» микротомного ножа.

ный столик просвечивающего микроскопа, размещая в поле зрения режущий край. При соблюдении правил хранения и работы с микротомными ножами каждодневно требуется только их правка. Правят ножи на четырехгранном ремне, натянутом на деревянную колодку. На стержень ножа надевают ручку (рис.14), на спинку – обушок (рис. 15).

Обушок формирует постоянный угол наклона ножа по отношению к ремню и позволяет быстро и правильно формировать фасетки. Ручка позволяет удобно и безопасно держать нож. Практика авторов показала, что в отличие от рекомендаций предыдущих пособий, нож удобнее держать двумя руками, особенно при правке и точке больших ножей. Это позволяет избежать резких движений, незначительных ударов при поворотах ножа, которые могут отразиться на качестве и сохранности фасеток. При правке нож ведут «обушком» вперед, поворот делают через «обушок» и ведут нож дугообразно в противоположном направлении. Для повседневной правки достаточно 15-20 движений по каждой стороне ремня с последующим контролем под микроскопом.

Иногда одной только правки недостаточно. Ножи с зазубринами, долго не использующиеся ножи требуют заточки. Существует множество разновидностей отечественных и импортных аппаратов для заточки ножей. Принципы их работы основаны на механическом или электролитическом затачивании. Электролитическая заточка основана на растворении стали ножа

в растворе электролита при пропускании через него электрического тока. Одновременно с затачиванием, нож покрывается пленкой, устойчивой к действию ржавчины.

Не теряет своей актуальности и заточка ножей вручную. Для заточки можно использовать абразивные бруски размером 8x30 см разной степени зернистости. Первым используют крупнозернистый желтый (бельгийский) камень. После него заточку продолжают на мелкозернистом белом камне (камень Арканзас или камень Миссисипи). Можно использовать природные камни разной зернистости или шлифовальные алмазные пасты разной степени абразивности. Так же как и при правке, на нож надевается «обушок», присоединяется ручка. Нож кладут обушком на камень, смоченный мыльной водой, керосином, машинным маслом или смесью глицерина с 70% спиртом (1:1). Алмазные пасты наносятся на влажное матовое стекло, закрепленное на деревянном бруске.

Использование шлифовальных камней при этом не требуется. Нож берут за ручку и противоположный конец обушка, обращая режущий край к себе, затем продвигают нож от ручки через все лезвие дугообразно вперед на точильщика до конца камня. Поворот делают через обушок и ведут нож дугообразно от себя режущим краем вперед. На нож не нужно надавливать, для заточки достаточно его собственной силы тяжести. Следует следить за тем, чтобы при заточке нож упирался в камень всем режущим краем с постоянным углом наклона, который определяется величиной обушка. Продолжительность точки зависит от состояния ножа, качества шлифовальных материалов, мастерства точильщика, занимает от 10 минут до нескольких часов и контролируется под микроскопом. Любая заточка требует заключительной правки на ремнях. Она проводится так же, как и описанная выше повседневная правка.

Следует упомянуть и пока редко встречающиеся одноразовые формы микротомных ножей, не требующие особого ухода и заточки. Металлические магнитные ножи позволяют получать до 1000 срезов с 50-60 парафиновых блоков. Стекланные ножи, чаще используемые в электронной микроскопии, можно приме-

нять и для резки парафиновых блоков. Готовятся они так же, как описано в главе, посвященной электромикроскопическим исследованиям, и отличаются лишь размерами режущей поверхности.

4.8. Изготовление срезов из материала, залитого в парафин

Сформированный и приклеенный на деревянный кубик блок закрепляют в объектодержателе микротомы. Длинную сторону блока можно располагать параллельно ножевым санкам. В этом случае одномоментная нагрузка на нож будет сокращаться, что важно при изготовлении срезов из плотных материалов. При расположении длинника блока перпендикулярно ножевым санкам увеличивается нагрузка на нож, но уменьшается сокращение парафина в направлении резки.

Устанавливают верхнюю плоскость блока горизонтально. Верхние слои парафина можно срезать вручную бритвой или скальпелем. До окончательной установки блока и получения первых срезов желательно пользоваться вспомогательным ножом. Это позволит дольше сохранить рабочий нож в оптимально хорошем состоянии. Нож (желательно группы С) укрепляют перпендикулярно ножевым санкам, если готовятся небольшие по площади срезы неплотных тканей или необходимо готовить серийные срезы в виде лент. При таком положении ножа нарезка плотных тканей может сопровождаться вибрацией и образованием характерных поперечных полос на срезах и поверхности блока. В этом случае нож желательно укреплять не строго поперечно, а немного косо.

Блок лучше развернуть короткой стороной к ножу. Это позволит уменьшить сопротивление и улучшить качество получаемых срезов. Кроме того, следует учитывать и угол наклона ножа по отношению к горизонтальной плоскости нарезаемого блока. При очень большом наклоне ножа материал будет не нарезаться, а соскабливаться. При горизонтальном расположении ножа первым с блоком встречается не режущий край, а основа-

ние фасетки, блок испытывает сильное сдавление и легко отывается от деревянной колодки. Кроме того, при таком положении ножа практически невозможно получить тонкие срезы. Угол наклона ножа подбирают эмпирически, обычно его величина составляет 13-15°.

После того, как блок и нож установлены, их осторожно сближают и приступают к окончательному выравниванию горизонтальной поверхности, срезая толстые срезы. Если не используется вспомогательный нож, то тонкую подгонку производят частью ножа, расположенной ближе к рукоятке, тогда как основная резка осуществляется обычно средней частью ножа. После того, как поверхность будет выровнена, а лишний верхний парафин снят, микрометрический винт переводят в положение желаемой толщины срезов. Режим резания может быть различным и подбирается обычно опытным путем.

Иногда нож ведут плавно и медленно, иногда быстрыми, толчкообразными движениями.

Изготовление срезов требует от лаборанта большого мастерства, терпения и усидчивости. Срезы могут не получаться не только из-за технических погрешностей нарезки, но и от ошибок, допущенных на предыдущих этапах подготовки материала (таблица 1).

Таблица 1

Погрешности, наиболее часто встречающиеся при изготовлении срезов, и способы их устранения (Саркисов Д.С., 1996)

Погрешность	Вероятная причина	Возможный способ устранения
Ткань выпадает, отделяясь от окружающего парафина	При заливке использовали недостаточно нагретый парафин	Перезалить блок в новую порцию парафина
	Материал плохо пропитан	Перезалить блок, начиная с этапа промежуточной среды
	Материал недостаточно долго находился в промежуточной среде, или промежуточная среда была загрязнена спиртом	

Нож вибрирует, оставляет на срезе и блоке поперечные полосы	Материал переуплотнен и пересушен при фиксации и проводке	Перед изготовлением каждого среза охладить поверхность кусочком льда, при повторной неудаче залить новый кусочек из «сырого» архива
Нож вибрирует с характерным скрипом, оставляя на блоке поперечные полосы	Нарезается очень плотный материал при поперечном положении ножа	Закрепить нож под углом по отношению к длиннику микротомата При необходимости декальцинировать материал
Крошится парафин	Понижена температура в помещении или выбран твердый парафин	Подышать на блок перед изготовлением очередного среза Поставить рядом обогреватель Перезалить блок, используя менее тугоплавкие сорта парафина
	Медленное охлаждение при заливке	Перезалить материал с этапа чистого парафина, быстро охладить на поверхности воды
	Выбран слишком большой угол наклона ножа	Уменьшить угол наклона ножа
На срезах видны полосы или разрывы, параллельные направлению движения ножа	Плохое качество заточки ножа	Эмпирически или с использованием микроскопа выбрать участок ножа, лишенный зазубрин, поменять или наточить нож
	В парафине содержатся плотные соринки	Перезалить материал в чистую порцию парафина
	В материале встречаются минерализованные образования	Декальцинировать материал или использовать другие способы изготовления срезов (шлифов)
Срезы прилипают к ножу	Электризация	Перед получением каждого среза подышать на блок
Срезы сморщиваются, прилипают к поверхности ножа	Высокая температура в помещении или материал залит в легкоплавкий парафин	Снизить температуру в помещении Перед изготовлением срезов охладить блок в холодильнике Положить на блок кусочек льда При повторении ситуации заливать материал в более тугоплавкий парафин

	Недостаточен угол наклона ножа	Увеличить угол наклона ножа
Срезы сморщиваются, ткань выбухает в середине	Недостаточно полно обрезаны излишки парафина по краям материала	Удалить излишки парафина
Срезы сморщиваются и плохо расправляются, ткань белесоватого цвета.	Плохое обезвоживание	Материал перезаливают, доводя в обратном порядке до 100% спирта, и вновь по схеме
Срезы скручиваются	Использование тугоплавкого парафина Низкая температура в помещении	Подышать на блок перед изготовлением среза или повысить температуру в помещении
	Большая толщина срезов	Уменьшить толщину срезов Придерживать формирующийся на ноже срез кисточкой Изменить скорость движения ножа при изготовлении срезов

Полученные срезы осторожно мягкой кисточкой или препаровальной иглой, располагаемой горизонтально, снимают с ножа и переносят на поверхность воды. Некоторые лаборанты накапливают срезы в коробочках, высланных темной матовой бумагой. Можно накапливать срезы на поверхности воды в чашке Петри или на поверхности капли воды на предметных стеклах. Вода, на которую переносятся срезы, должна быть теплой, тогда срезы расправляются, но не выше температуры плавления парафина, так как мелкие складки на срезах сминаются необратимо. Вода должна быть дистиллированной или, в крайнем случае, свежekiпяченой. В некипяченой воде под срезами собираются пузырьки воздуха, что потом отражается на качестве препарата. Срезы помещаются на поверхность воды стороной, которая была обращена к ножу (блестящей). Противоположная (матовая) сторона хуже приклеивается к предметному стеклу. Кроме того, такой прием позволяет стандартизировать ориентировку срезов, что особенно важно при изучении серийных материалов, для последующей реконструкции изучаемых

объектов. На поверхности воды срезы могут оставаться несколько дней. Затем их монтируют на заранее приготовленные предметные стекла. Предметные стекла предварительно моют и обезжиривают (см. главу 1). Качество обезжиривания проверяют, капнув на стекло воду. На обезжиренном стекле капля растекается. На плохо обезжиренном стекле формируется выпуклая капля. Для лучшего приклеивания среза к стеклам используют различные смеси.

При традиционных методах окрашивания проще и дешевле использовать «куриный клей». Свежий белок куриного яйца взбивают в пену, фильтруют через крупнопористый фильтр, смоченный дистиллированной водой, смешивают с глицерином в соотношении 1:1, для продолжительного хранения добавляют несколько кристаллов тимола. Можно использовать раствор поли-L-лизина (1 мг/мл), особенно в тех случаях, когда предполагается использование цитохимических методов окрашивания с предварительной обработкой протеазами. Используют также смесь сыворотки крови, дистиллированной воды и 5% формалина в соотношении 3:1:1. Выбранную в соответствии с задачами исследования смесь наносят в небольшом количестве (около 10 мкл) на предметное стекло, равномерно растирают обезжиренным пальцем или концом другого стекла, как при приготовлении мазка крови. Слой должен быть ровным и настолько тонким, чтобы были видны цветные полосы, возникающие вследствие интерференции света.

Партию стекол можно приготовить заранее, предварительно помечая обработанную сторону, так как тонкая пленка «клея» практически незаметна. При иммуноцитохимических исследованиях, когда большие трудности создает фоновое неспецифическое окрашивание, можно использовать и необработанные стекла. В емкость, где собираются срезы, капают несколько капель казеинового клея, перемешивают. Обработанные клеем срезы можно монтировать на чистые стекла. Для того чтобы монтировать собранные в чашке с водой срезы на предметное стекло, его одним концом опускают в чашку, подхватывая срез. Придерживая препаровальной иглой срез, сливают воду, а ее

остатки промокают фильтровальной бумагой. Если предполагается фотодокументирование результатов исследования, то срезы лучше размещать в центральной части стекла, так как для большинства современных фотоустановок краевые участки предметного стекла оказываются недоступными. С другой стороны, размещение срезов на одном конце предметного стекла позволяет при дальнейшем окрашивании экономить реактивы и красители.

Некоторые методы окраски (например, окраска гликогена по Бесту) исключают контакт парафиновых срезов с водой. В этом случае приходится расправлять срезы на поверхности подогретого 60-80% спирта (в 90-96% спирте парафиновые срезы опускаются на дно емкости). Если получаемые с ножа срезы не сильно сморщиваются и закручиваются, то расправить их можно на предметном стекле вручную, без использования жидкостей – сухим способом. Это очень трудоемкая операция, поэтому пользуются ей только при применении методик окраски, исключающих контакт срезов с водой или спиртом.

В любом случае, приклеенные срезы для лучшего сцепления со стеклом желательно просушить на специальном прогреваемом столике для сушки, в термостате при температуре 37-40°C, при комнатной температуре в течение суток или, если не позволяет время, кратковременным нагреванием над пламенем спиртовки. Хорошо просушенные срезы лучше депарафинизируются, реже отклеиваются при окраске, визуально более прозрачны по сравнению с беловатыми непросушенными срезами.

4.9. Изготовление срезов из материала, залитого в целлоидин

Для изготовления целлоидиновых срезов можно пользоваться любыми микротомными ножами, но предпочтительны ножи групп А и В. Устанавливают их под более острым углом по сравнению с углом нарезки парафиновых срезов. Нож и блок во время резания постоянно смачивают 70-80% спиртом. В чаш-

ку со спиртом переносят и полученные срезы. Во время резания могут выявляться дефекты предыдущих этапов обработки материала, как и при резке парафиновых блоков. Однако, в сравнении с парафиновым, целлоидиновый материал резать гораздо проще. Без значительного мастерства можно готовить срезы толщиной от 5 до 150 мкм. До последующей окраски (если она не проведена ранее, как, например, при импрегнации солями серебра) срезы можно длительно хранить в 70% спирте.

4.10. Изготовление срезов с использованием замораживающего микротом

На замораживающем микротоме готовят срезы из материала, фиксированного в спирте или формалине, реже – залитого в желатин. Фиксированный материал тщательно промывают в воде, моделируют блок-кусочек толщиной 3-4 мм. Далее водой смачивают подготовленный блок и кусочек фильтровальной бумаги. На столик микротомы кладут фильтровальную бумагу, а на нее – подготовленную для резки ткань. Придерживая блок пальцем, осторожно приоткрывают вентиль, подавая небольшими порциями углекислоту. Кусочек начинает снизу белеть – замораживаться. Для быстрого, равномерного и экономного замораживания материала можно после примораживания кусочка, накрыть его металлическим колпачком. Углекислота при этом скапливается под колпачком, быстро воздействуя по всей поверхности замораживаемого кусочка.

После полного замораживания кусочек подводят под нож, как и при резке парафиновых средств выравнивают верхнюю поверхность, устанавливают нужный наклон ножа и приступают к изготовлению срезов (обычно толщиной 5-25 мкм). Изготовленные срезы подушечкой указательного пальца или мягкой кисточкой переносят в воду. Долго сохранять срезы можно в 5-10% формалине или в 70-96% спирте, если это допускают выбранные методики дальнейшего окрашивания.

При пере замораживании материала получаемые срезы крошатся, ломаются. Можно или пальцем немного согреть поверхность блока, или прекратить на некоторое время резку, ожидая что материал немного оттаяет. Это позволит в дальнейшем получать срезы удовлетворительного качества. Недостаточное замораживание приводит к тому, что ткань не режется, а соскабливается. Для получения хороших срезов в этом случае ткань достаточно дополнительно подморозить.

4.11. Изготовление срезов большой площади (гистотопограмм)

Возможности стандартных ротационных, санных, замораживающих микротомов позволяют получать срезы диаметром до 60-70 мм. Однако, некоторые гистотопографические исследования требуют изготовления срезов большей площади.

Это легко сделать, используя специальные микротомы со сменными столиками. Особенности дальнейшей обработки таких срезов состоят в выборе емкостей для проводки и окраски большей, чем обычно площади. Предметные стекла тоже должны соответствовать площади среза. В качестве предметных стекол удобно использовать отмытые фотопластинки. Если предстоит обзорное гистотопографическое исследование, то срезы можно заключать между двумя фотопластинками. Если предполагается более детальное исследование, то можно покрывать срезы отмытой и высушенной рентгеновской пленкой, заключать в бальзам или полистирол без покровных стекол.

Независимо от способа изготовления и монтирования срезов, их необходимо маркировать. Существует множество способов маркировки. Наносить условные обозначения можно алмазным стеклорезом, простым карандашом по матовому концу предметного стекла, тушью или другими маркерами. Для большей сохранности надписи можно покрывать полистиролом или прозрачным лаком для ногтей.



ГЛАВА 5

МЕТОДИКИ ОКРАШИВАНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Если посмотреть под микроскопом неокрашенный препарат, можно заметить, что разные структуры практически одинаково преломляют свет. Для детального изучения срезы необходимо окрашивать. В основе окрашивания лежат сложные физико-химические процессы взаимодействия красителей со структурами тканей. В связи с этим выделяют 3 основные группы традиционных красителей: основные, кислые и нейтральные.

Основные красители – это основания или их соли, которые взаимодействуют в тканях со структурами кислой природы (хроматин ядер, ядрышки). Структуры, окрашиваемые на препарате основными красителями, называются базофильными. В группу основных красителей входят гематоксилин, тионин, сафранин, галлоцианин, метиловый зеленый.

Кислые красители – это кислоты и их соли, ими окрашивают обычно цитоплазматические структуры и волокнистый компонент межклеточного вещества. Структуры, окрашиваемые кислыми красителями, называют оксифильными. К кислым красителям относят эозин, эритрозин, конго красный, пикриновую кислоту.

Нейтральные красители – это соединения кислот, оснований и их соли. В эту группу входят судан III, судан IV, метиленовый синий.

Способы гистологического окрашивания подразделяются на простые - при окрашивании одним красителем (например, окраска метиленовым синим), и сложные - при использовании последовательно нескольких красителей (например, окраска гема-

токсиллин-эозином). Другая классификация выделяет прогрессивный и регрессивный тип окрашивания. При прогрессивном окрашивании насыщение ткани красителем продолжается до получения удовлетворительного результата. При регрессивном – препарат заведомо переокрашивают, а затем дифференцируют (отмывают) до желаемой интенсивности окраски. Если раствор красителя непосредственно связывается со структурами ткани, то такое окрашивание называют прямым. Окрашивание после протравливания ткани (например, спиртовым раствором пикриновой кислоты, раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты) называют непрямым.

5.1. Подготовка срезов к окрашиванию

Парафиновые срезы перед окрашиванием необходимо освободить от парафина – депарафинировать. Депарафинирование обеспечивает лучшее взаимодействие тканевых структур с красителями. Кроме того, при недостаточном депарафинировании в тканях (особенно в ядрах клеток) могут появляться кристаллы, обладающие двойным лучепреломлением, что затрудняет интерпретацию результатов гистологического исследования и правильную постановку диагноза.

Для извлечения парафина пользуются любыми органическими растворителями – бензолом, ксилолом, толуолом. Следует помнить, что эти вещества очень токсичны, летучи и легко воспламеняемы, поэтому депарафинирование следует проводить только в работающем вытяжном шкафу. Обычно достаточно 2-3 порций растворителя по 10-15 минут. Ускорить процесс и улучшить результаты депарафинирования можно повышением температуры растворителя до 37°C (в термостате). Затем срезы переносят на 2-3 минуты в первую порцию абсолютного спирта, после этого – на 1-2 минуты во вторую порцию, споласкивают в двух порциях 96% спирта и переносят в воду. Если при окрашивании предполагается использование спиртовых растворов красителей, то дистиллированную воду исключают.

Целлоидиновые срезы, как правило, не требуют специальной подготовки. При использовании водных растворов красителей их достаточно перенести из 70% спирта в 50%, а затем в дистиллированную воду. Если выбранная методика окраски требует удаления целлоидина из среза, то для этого используют растворители целлоидина, например, чистое гвоздичное масло. Срезы монтируют на предметных стеклах, прижимают фильтровальной бумагой, смоченной 70% спиртом, а затем заливают гвоздичным маслом на 1-10 минут (в зависимости от толщины среза). После этого препарат промывают в абсолютном спирте или ацетоне, переносят в 70% спирт и, если это необходимо по прописи методики окраски, собирают в дистиллированной воде.

5.2. Общие рекомендации по окрашиванию

После подготовки срезов можно приступать к окрашиванию. Далее мы предложим прописи основных методик окраски, часто встречающихся в гистологической практике. Нет необходимости запоминать последовательность этапов окраски и методики приготовления рабочих растворов. Но каждый лаборант должен всегда иметь под рукой прописи основных методов окраски и точно соблюдать все рекомендации, касающиеся подготовки необходимых реактивов, температурных и временных параметров окрашивания. Можно лишь рекомендовать кратко выписывать основные прописи на отдельные карточки, а прописи часто встречающихся методик хранить под стеклом рабочего стола.

Посуду для окрашивания выбирает сам лаборант в зависимости от количества окрашиваемых препаратов, количества необходимых реактивов и оснащения лаборатории. Не обязательно иметь для этого специальную химическую посуду, пригодятся любые стаканчики с вертикальными стенками, баночки емкостью 70-100 мл. Если количество окрашиваемых срезов невелико, то краситель можно наносить пипеткой прямо на предметное стекло, после окрашивания сливать и использовать повторно.

Окрашивание проводят по стандартным методикам. Однако всегда следует учитывать качество исходных реактивов, которое обусловлено как фирмой-изготовителем, так и временем и условиями хранения. При приготовлении новых рабочих растворов или использовании долго хранящихся разведенных рабочих растворов красителей, результаты окрашивания первых срезов необходимо контролировать под микроскопом при малом увеличении. При просмотре срез необходимо постоянно увлажнять, так как высыхание может привести к его растрескиванию. Если необходимо, срез можно докрасить или, напротив, дифференцировать в воде или растворе спирта для уменьшения интенсивности окрашивания.

5.3. Просветление и заключение срезов

В настоящее время разработано огромное количество методик окраски, однако заключающим этапом приготовления препаратов всегда является просветление и заключение срезов. Целью этого этапа является создание прозрачности срезов и их защита от высыхания, загрязнения и повреждения.

Просветляющие вещества и среды заключения можно разделить на 2 группы – среды, смешивающиеся, и среды, не смешивающиеся с водой. Чаще всего пользуются средами 2-й группы. К ним относят смолы растительного происхождения – бальзамы (канадский, пихтовой, кедровый), пластмассу – полистирол.

Канадский бальзам получают из смолы бальзамной пихты. В лабораторию канадский бальзам поступает в виде светло-желтых твердых ломких конгломератов, которые растворяются в органических растворителях – толуоле, бензоле, ксилоле. Для приготовления рабочего раствора (60-65%) кусочки смолы заливают растворителем на несколько дней. Процесс растворения ускоряется при повышении температуры до 37-40°C (в термостате). Рабочий раствор должен иметь консистенцию жидкого меда или глицерина.

При работе растворитель испаряется и бальзам густеет, поэтому желательно хранить рабочий раствор в склянке с притертой или резиновой пробкой, в которую воткнута стеклянная палочка. Можно держать склянку с бальзамом под колпаком. Загустевший бальзам можно разбавить растворителем, слишком жидкий раствор необходимо поддерживать открытым - для испарения лишнего растворителя.

Синтетическая пластмасса – полистирол, широко внедряется в практику патоморфологии. Он более доступен, в связи с широким развитием нефтеперерабатывающей промышленности, дешев, быстро высыхает, часто не требует использования покровных стекол, прозрачен. Рабочий (20-30%) раствор готовят так же, как и канадский бальзам. К недостаткам полистирола можно отнести его способность быстро высыхать и засасывать под покровные стекла пузырьки воздуха (этого не произойдет, если на покровное стекло до полного высыхания полистирола поставить небольшой груз). Поскольку в практике патогистологических лабораторий часто не пользуются покровными стеклами, то этот недостаток полистирола становится его преимуществом. Следует помнить и то, что при хранении препаратов в пленке полистирола появляются микротрещинки. Это затрудняет микроскопирование и, особенно, фотодокументирование. Для придания полистиролу большей эластичности в рабочий раствор добавляют пластификатор (чаще дибутилфталат – 6% рабочего раствора).

При использовании для заключения препаратов сред, не смешивающихся с водой, после окрашивания необходимо тщательное обезвоживание в спиртах восходящей концентрации (70%, 96%, 100%).

Если для окрашивания использовался спиртовой раствор красителя, то обезвоживание начинают со спирта одноименной концентрации, доводят до 100% спирта, а затем помещают в просветляющее вещество. Наиболее распространенными и неагрессивными по отношению к окраске просветляющими веществами являются ксилол, толуол, бензол, реже – эфирные и анилиновые масла. Выбор реактива обусловлен возможностями лабо-

ратории и требованиями конкретно выбранной методики окраски. Например, при окраске нейронов по Нисслию не следует пользоваться карбол-ксилолом, анилиновое масло в этом случае будет предпочтительным. Однако анилиновым маслом нельзя пользоваться при окраске по Ван-Гизону, так как оно сильно извлекает пикриновую кислоту. При многих специальных методах окраски возможно последовательное использование нескольких просветляющих веществ. Сначала – вещества, не требующие абсолютного спирта (эфирное масло, скипидар, карбол-ксилол), а затем – ксилол. Для контроля качества просветления лаборант обычно держит под стеклом лист черной матовой бумаги. На черном фоне недостаточно просветленные участки выглядят беловатыми, непрозрачными. Хорошо просветленные срезы заключают в светопреломляющие срезы и, если необходимо, покрывают покровными стеклами.

Среды заключения, относящиеся к группе смешивающихся с водой, используют для изготовления ориентировочных непостоянных препаратов или при некоторых специальных методах исследования, таких, как окрашивание амилоида или липидов.

В эту группу входит глицерин, глицерин-желатин, жидкость Феррата, гумми-сироп по Апати, поливиниловый спирт.

Для приготовления гумми-сиропа Апати, при постоянном помешивании на водяной бане растворяют гуммиарабик:сахарафинад:дистиллированную воду в соотношении 1:1:1. Для длительного хранения добавляют несколько кристалликов тимола.

Для приготовления жидкости Фарранта 10 г гуммиарабика растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляют 10 мл глицерина, 0,03 г мышьяковистой кислоты и тимол. Большинство сред, относящихся к этой группе, используют в подогретом виде. Они являются одновременно и средами заключения и просветляющими веществами, поэтому обезвоживание и просветление по схеме сред, не смешивающихся с водой, не требуется. После окрашивания препараты сразу заключают и накрывают покровным стеклом. Для избежания высыхания можно окантовывать покровные стекла полосками парафина или целлоидина, но часто и без этой процедуры препараты сохраняются годами.

Покровные стекла должны быть абсолютно чистыми, тонкими и ровными. Под покровными стеклами иногда появляются пузырьки воздуха. Если это все-таки произошло, то на край покровного стекла со стороны пузырька нужно капнуть дополнительную каплю бальзама, слегка придавить покровное стекло, после этого бальзам затечет в свободное пространство. Стекла толще 0,17 мм не позволяют микроскопировать с иммерсионным объективом. Мойются покровные стекла, как и лабораторная посуда (см. главу 1), обязательно протираются тряпкой, не оставляющей волокон. Можно использовать обломки стекол, если они соответствуют площади накрываемого среза. Можно использовать покровные стекла повторно. Ненужный препарат нагревают над пламенем спиртовки, после этого покровное стекло легко сдвигается препаровальной иглой. Собранные стекла выдерживают в отходах растворителей, а затем отмывают обычным способом. Очень сложно снять покровные стекла, если средой заключения был полистирол.

При изготовлении препаратов большой площади вместо покровного стекла можно пользоваться отмытой рентгеновской пленкой. Пленку выдерживают в горячем растворе стирального порошка или 20% растворе едкой щелочи, щеткой снимают фотоэмульсионный слой, тщательно промывают в проточной воде и высушивают. Пригодна прозрачная пленка, не имеющая царапин. Можно вообще не пользоваться покровными стеклами и их заменителями, а покрывать срез тонким слоем жидкого полистирола или поливинилового спирта.

5.4. Наиболее часто встречающиеся общие методы окрашивания

5.4.1. Окрашивание гематоксилин–эозином

Самая распространенная в настоящее время окраска – гематоксилин-эозином, предполагает последовательное окрашивание ядерным (основным) красителем – гематоксилином, и цитоплазматическим (кислым) – эозином. Гематоксилин окрашивает

в сине-фиолетовые тона (базофильно) оболочку ядер клеток, хроматин. Эозин окрашивает в розово-красно-оранжевые тона цитоплазму и некоторые неклеточные структуры (волокна). Окраску гематоксилин-эозином очень широко используют и в практической патоморфологии, и в научных исследованиях.

Гематоксилин представляет собой эфирную вытяжку из кампешевого дерева, произрастающего в Америке. Гематоксилин имеет вид бесцветных или буроватых кристаллов, хорошо растворимых в спирте и плохо – в воде. Красящими свойствами обладает продукт окисления гематоксилина – гематеин. Способов окисления гематоксилина очень много. Стали классическими гематоксилины Эрлиха, Кораца, Майера, Маллори. Лаборант, как правило, выбирает способ приготовления гематоксилина, наиболее приемлемый для данной лаборатории, удобный для использования, отвечающий задачам конкретного исследования. С эозином можно комбинировать любой окисленный квасцовый гематоксилин.

Гематоксилин Эрлиха

Для приготовления гематоксилина Эрлиха 2 г кристаллического гематоксилина растворяют в 100 мл 96% спирта, 3 г алюмокалиевых или алюмоаммонийных квасцов – в 100 мл дистиллированной воды. Оба раствора смешивают, добавляют 100 мл глицерина и 10 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор выдерживают 2 недели, периодически помешивая. О готовности красителя судят по появлению темно-вишневого окрашивания.

Гематоксилин Ганзена

Гематоксилин Ганзена удобен быстротой приготовления. 1 г кристаллического гематоксилина растворяют в 10 мл абсолютного спирта. 20 г алюмокалиевых квасцов – в 100 мл дистиллированной воды. Оба раствора смешивают, добавляют 3 мл насыщенного раствора перманганата калия, нагревают, охлаждают, фильтруют. Раствор не требует созревания, сразу готов к применению.

Водный гематоксилин Маллори

Смешивают 0,25 г кристаллического гематоксилина, 5 г алюмоаммонийных квасцов, 100 мл дистиллированной воды и выдерживают на свету при комнатной температуре 10 суток. Добавляют 44 мг перманганата калия, 0,25 г тимола, 10-15 минут перемешивают на магнитной мешалке, фильтруют.

Гематоксилин Гарриса

1 г кристаллического гематоксилина растворяют в 10 мл 96% спирта, 20 г алюмоаммонийных квасцов – в 200 мл дистиллированной воды. Смешивают оба раствора, добавляют 12 мл глицерина и 0,5 г оксида ртути. Смесь нагревают до 100°C, остужают, фильтруют. Перед использованием подкисляют ледяной уксусной кислотой из расчета 2 мл кислоты на 100 мл красителя.

Гематоксилин Корацци

Кроме быстроты приготовления гематоксилин Корацци отличается и быстротой окраски. Для получения удовлетворительных результатов достаточно 1-2-минутного окрашивания. Для приготовления гематоксилина Корацци на мешалке при слабом прогреве смешивают до полного растворения 0,1 г кристаллического гематоксилина, 5 г алюмокалиевых квасцов, 3-4 кристалла иодата калия в 100 мл дистиллированной воды. Затем добавляют 25 мл глицерина и фильтруют.

Железные гематоксилины Вейгерта, Гейденгана, Брусси обычно не сочетают с эозином. Поэтому мы опишем их приготовление с другими ядерными красителями.

Все гематоксилины хорошо хранятся, но при очень длительном хранении могут перезреть (окисляться слишком сильно), и в связи с этим быстро переокрашивать ядра. В этом случае рабочий раствор красителя можно разбавлять дистиллированной водой или 2% раствором квасцов. Можно дифференцировать препараты в подкисленном спирте с последующим восстановлением щелочным раствором, но лучше отдавать предпочтение прогрессивному окрашиванию. Время окрашива-

ния конкретным раствором гематоксилина можно подобрать опытным путем с контролем под микроскопом.

Эозин – это синтетический краситель, выпускается в нескольких модификациях. Одни лучше растворяются в воде, другие – в спирте. Как правило, используют 1% водные или спиртовые растворы. Краситель хорошо хранится, но свежие рабочие растворы предпочтительней.

Примерная схема окраски препаратов гематоксилин-эозином

1. Парафиновые, целлоидиновые или замороженные срезы доводят до воды (см. подглаву «Подготовка срезов к окрашиванию»).

2. Окраска гематоксилином в течение 1-15 минут (в зависимости от активности красителя).

3. Промывка в воде – несколько минут.

4. Дифференцировка в спирте, подкисленном соляной кислотой (1% раствор соляной кислоты в 70% спирте), несколько секунд с последующим восстановлением подщелоченной водой (около 1 минуты). Этап желателен, но не обязателен.

5. Промывка в проточной воде – 10 минут (можно дольше).

6. Ополаскивание дистиллированной водой.

7. Окраска 1% эозином – 1-2 минуты.

8. Ополаскивание дистиллированной водой.

9. Обезвоживание, просветление, заключение.

Кроме окраски гематоксилин-эозином общие методы включают простые методы окрашивания другими ядерными или цитоплазматическими красителями и их комбинации.

5.4.2. Окрашивание ядерными красителями

Кармин – краситель, получаемый из насекомого кашенили (*Coccus casti*), можно использовать и при простой окраске, и в комбинации – например, для подкрашивания ядер при выявлении эластического каркаса соединительной ткани.

Самым простым способом приготовления красящего раствора кармина является кипячение 1% водного раствора в течение 15 минут с последующим охлаждением, фильтрацией и добавлением 40% формалина из расчета 10 мл на 100 мл красителя. Срезы доводятся до воды, окрашиваются от нескольких минут до 24 часов, промываются дистиллированной водой, дифференцируются в солянокислом спирте, просветляются и заключаются как обычно.

Лучшие результаты дает окрашивание квасцовым кармином или литиевым кармином Орта.

Квасцовый кармин готовят следующим образом. Нагревают при помешивании до полного растворения 5 г алюмокалиевых или алюмоаммонийных квасцов в 100 мл дистиллированной воды, добавляют 1 г кармина. При небольшой интенсивности нагрева, предохраняя от избыточного выпаривания, раствор кипятят 20-30 минут, затем охлаждают и фильтруют. Для лучшей сохранности в раствор добавляют 1-2 мл 40% формалина.

Для окраски срезы доводят до воды, окрашивают от нескольких минут до 24 часов (квасцовый кармин практически не перекрашивает срезы), промывают в нескольких порциях воды, просветляют и заключают как обычно.

Литиевый кармин Орта готовят следующим образом: 5-10 минут кипятят 2,5 г кармина, растворенного в 100 мл насыщенного при 20°C водного раствора углекислого лития. Затем раствор охлаждают и фильтруют. Красят как обычно (продолжительность окраски – 5-20 минут, в зависимости от активности красителя). Особенностью окраски литиевым кармином является то, что из красителя срезы сразу переносят в солянокислый спирт, который одновременно и фиксирует, и дифференцирует окраску. Если между красителем и спиртом использовать воду, то она извлечет не только излишки красителя, но и практически обесцветит срезы. После солянокислого спирта препараты просветляют и заключают по обычной схеме. Все модификации кармина окрашивают ядра клеток в красный цвет.

Из ядерных красителей следует упомянуть и железный *ге-матоксилин Гейденгайна*. Хорошие результаты удается полу-

чить при простом окрашивании без использования подкраски цитоплазматическими красителями, особенно при изучении структур ядра на различных этапах деления клетки, а также для окраски поперечнополосатой мышечной ткани. При правильном окрашивании железным гематоксилином Гейденгайна ядра клеток должны быть черными с рельефно-выраженными внутриядерными структурами, цитоплазма – серого цвета.

Гематоксилин Гейденгайна (1 г кристаллического гематоксилина, 10 мл 96% спирта, 90 мл дистиллированной воды) созревает на свету при доступе воздуха в течение 4-5 недель. О готовности красителя можно судить по потемнению изначально светло-коричневого тона раствора, покраснение красителя говорит о его непригодности (перезревание краски, использование грязных реактивов или посуды). После созревания раствор разбавляют дистиллированной водой в 2 раза.

Окрашивание железным гематоксилином ведут регрессивным способом, то есть заведомо переокрашивают препараты, а затем дифференцируют до нужной интенсивности окраски. Депарафинируют и доводят препараты до воды по обычной схеме, затем протравливают в 2,5% растворе свежих железоаммонийных квасцов в течение 3-12 часов. После тщательной промывки в нескольких порциях дистиллированной воды окрашивают гематоксилином (до 36 часов), прополаскивают дистиллированной водой, а затем под контролем микроскопа дифференцируют 0,5-2,5% раствором железоаммонийных квасцов. Для тщательного отмывания квасцов по окончании дифференцировки срезы можно держать в воде от 30 минут до 24 часов. Просветляют и заключают по обычной схеме.

Быстро и менее трудоемко проводится окрашивание *железным гематоксилином Брусси*. При использовании этого красителя ядра и их структуры тоже окрашиваются в синевато-черный цвет. Для приготовления железного гематоксилина Брусси растворяют 1 г кристаллического гематоксилина в 100 мл воды при 40°C. Железоаммонийные квасцы (8 г) растворяют в 100 мл дистиллированной воды тоже при температуре 40°C. После смешивания растворов гематоксилина и квасцов и фильт-

рации краситель готов. Окрашивают без особенностей в течение 1 минуты.

Железный гематоксилин Вейгера обычно используют в комбинации с цитоплазматическим красителем – пикрофуксином (окраска по Ван-Гизону). Этот способ окраски используют и как общий – для обзорного изучения препаратов, и как специальный – для изучения соединительных и мышечных тканей (см. главу «Методы окрашивания соединительных и мышечных тканей»).

Для залитых в желатин замороженных срезов в качестве ядерного красителя часто используется *галлоцианин*. Галлоцианин можно применять и как специальный краситель в нейроморфологии, так как кроме ядер он четко окрашивает тигроидное вещество нейронов. Для приготовления красящего раствора кипятят при постоянном перемешивании 0,1-0,2% раствор галлоцианина в 5% растворе хромовых квасцов. После охлаждения раствор фильтруют. Краситель не требует созревания, хорошо окрашивает в течение месяца после приготовления. Продолжительность окраски до 48 часов.

Может показаться необычным, но экономичным, не потерявшим актуальности метод *окрашивания ядер клеток соком черники или аронии (черноплодной рябины)*.

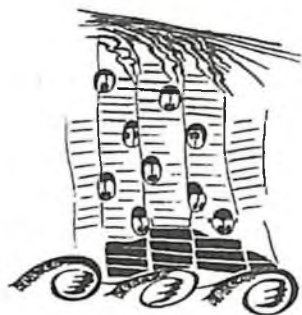
Для приготовления красящего раствора свежие вымытые ягоды размельчают (лучше миксером), заливают 96% спиртом в соотношении 1:1. Настаивают 1 сутки, затем фильтруют или центрифугируют. Настой хорошо хранится в темном месте при комнатной температуре, по крайней мере, до нового урожая. Для приготовления рабочего раствора заготовленный настой разводят равным количеством 2-2,5% раствора алюмокалиевых квасцов. Если добавить в него несколько кристаллов тимола, то красящие свойства такой краситель не потеряет в течение двух месяцев. Пользуются настоем ягод так же, как и гематоксилином. Ядра клеток окрашиваются в темно-фиолетовый цвет.

5.4.3. Окрашивание цитоплазматическими красителями

Окрашивание цитоплазмы клеток происходит при связывании оснований кислыми красителями. В группу кислых красителей, постоянно используемых в практике гистологической лаборатории, входят эозин, пикриновая кислота, оранжевый G, кислый фуксин, азокармин. Такие красители используют в виде 1% водных или спиртовых растворов. Окраска обычно непродолжительна и колеблется от 5 секунд до 3-5 минут, в зависимости от качества и активности красителя. Излишки красителя легко удаляются промыванием дистиллированной водой или при обезвоживании спиртами.

Расширять спектр общих методов окраски в зависимости от задач исследования, способов фиксации и заливки, возможностей лаборатории можно, комбинируя ядерные и цитоплазматические красители.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНЫХ И МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ



При описании специальных методов окраски мы рассмотрим только традиционные методы. В то же время следует учитывать возможность использования различных гистохимических, в том числе гистоферментативных, методов окрашивания, фазово-контрастной, поляризационной микроскопии и других методов, о которых будет сказано в следующих главах.

6.1. Окраска по Ван-Гизону

Этот метод может рассматриваться и как специальный, и как общий, заменяющий окраску гематоксилин-эозином. В качестве ядерного красителя используют гематоксилин Вейгерта, цитоплазматического – пикрофуксин.

Приготовление рабочих красящих растворов

Железный гематоксилин Вейгерта готовится перед использованием путем смешивания в соотношении 1:1 растворов, известных под названием Вейгерт I и Вейгерт II.

Вейгерт I: 1% кристаллический гематоксилин в 96% спирте.

Вейгерт II: 50% раствора гексагидрата перихлорида железа, 1 мл концентрированной соляной кислоты и 95 мл дистиллированной воды.

Правильно приготовленный железный гематоксилин Вейгерта имеет темно-фиолетовый цвет, сохраняет его около 40 минут. Побурение или позеленение окраски свидетельствует о непригодности красителя.

Пикрофуксин. 10 мл насыщенного при комнатной температуре водного раствора пикриновой кислоты смешивают с 1 мл 1% водного раствора кислого фуксина. Краситель имеет насыщенный гранатовый цвет, хорошо хранится несколько месяцев. Авторская (по Ван-Гизону) модификация предлагает смешивать 5 мл 1% раствора кислого фуксина с 95 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Добавление к этой смеси 0,25 мл соляной кислоты позволяет получать более контрастные препараты.

Перекрасить препарат гематоксилином Вейгерта практически невозможно, так как последующая окраска пикрофуксином оказывает дифференцирующий эффект (за счет действия пикриновой кислоты). Однако, окрашивание по Ван-Гизону требует определенной квалификации. Неудачное окрашивание ядер (в бурый цвет) может быть обусловлено неудовлетворительным качеством гематоксилина. При окраске пикрофуксином время подбирают эмпирически, контролируя окрашивание по крайней мере первых препаратов. Перекрашивание гематоксилином ликвидируют более продолжительным окрашиванием пикрофуксином. Перекрашивание кислым фуксином ликвидируют промыванием в воде, пикриновой кислотой – 96% спиртом. Однако пикриновая кислота, напротив, слишком сильно извлекается 96% спиртом при обезвоживании, поэтому для этих целей используют слегка подкрашенный пикриновой кислотой 96% спирт. Недостатком этого метода является нестойкость окраски. Через несколько месяцев фуксин выцветает, и препараты становятся однородно желтыми. Если по каким-то причинам не удастся использовать гематоксин Вейгерта, то можно его заменить квасцовыми гематоксилинами Эрлиха, Караци, Делафильда (см. выше).

Методика окраски

1. Срезы депарафинируют, доводят до воды.
2. Окраска гематоксилином Вейгерта – 3-10 минут.
3. 3-х кратное промывание водопроводной водой.
4. Окраска пикрофуксином – 2-7 минут (под контролем микроскопа!).
5. Быстрая промывка в воде (сильно извлекается фуксин).

6. Обезвоживание (извлекается пикриновая кислота).
7. Просветление (любое просветляющее вещество, кроме анилинового масла, извлекающего пикриновую кислоту).
8. Заключение в светопреломляющие среды.

Результат

Ядра клеток – черно-коричневые или фиолетово-черные; коллагеновые волокна – красно-черные; мышечная ткань, цитоплазма других клеток, клетки крови, кератин – желтые.

6.2. Окрашивание пикро-пунцовым С

В сравнении с методом Ван-Гизона окрашивание некапризное, стойкое в течение нескольких лет.

Приготовление красителя

Смешать 10 мл 1% водного раствора пунцового С, 86 мл насыщенного при комнатной температуре раствора пикриновой кислоты, 4 мл 1% раствора уксусной кислоты.

Методика окраски

1. Депарафинирование и доведение среза до воды.
2. Окраска любым железным гематоксилином (не надо опасаться переокрашивания, так как пикриновая кислота обладает дифференцирующим свойством).
3. Промывка в нескольких сменах водопроводной воды.
4. Окраска пикро-пунцовым С – 3-5 минут (под контролем микроскопа).
5. Дифференцировка солянокислым спиртом.
6. Обезвоживание, просветление, заключение.

Результат

Ядра клеток и симпласта – черно-коричневые, коллагеновые и ретикулярные волокна – красные; эластические волокна, мышечная ткань, эритроциты – желтые.

6.3. Окрашивание пикро-индигокармином

В отличие от метода Ван-Гизона железный гематоксилин может быть заменен кармином (см. выше). Вместо пикрофуксина используют 0,25% раствор индигокармина в насыщенном при комнатной температуре растворе пикриновой кислоты. Методика окраски такая же, как и при использовании метода Ван-Гизона. Результат: ядра – черно-коричневые или красные, в зависимости от выбора ядерного красителя; коллагеновые волокна – синие или сине-зеленые; мышечная ткань – желтая.

6.4. Окрашивание пикро-анилиновым синим (аллохромный способ Лилли)

Приготовление красящих растворов

Железный гематоксилин любой модификации (см. выше). Пикро-анилиновый синий готовится растворением 0,1 г анилинового или метиленового синего в 100 мл насыщенного при комнатной температуре раствора пикриновой кислоты.

Методика окраски

Проводится как и при окраске по методу Ван-Гизона, но пикрофуксин заменяется пикро-анилиновым синим, дифференцировка – 1% раствором уксусной кислоты и 96% спиртом.

Результат

Коллагеновые, ретикулярные волокна и базальные мембраны – синие. Если этот метод соединить с ШИК - реакцией (см. главу 4), проводя ее после окрашивания гематоксилином, то базальные мембраны окрашиваются в розово-фиолетовые тона, коллагеновые и ретикулярные волокна – в синие, мышечная ткань – в желто-зеленые.

Более изящное окрашивание дают *трехцветные методы окраски*. Термин «трехцветные методы» означает способы окраски, в которых используют два или более кислых красителя и фосфорновольфрамовую или фосфорномолибденовую кислоты. Кислоты могут входить в состав красящих растворов или при-

меняться для предварительного протравливания. Преимуществом этих методов перед окраской по Ван-Гизону является окрашивание отдельных тонких коллагеновых и ретикулярных волокон, базальных мембран, гиалина, фибриноида, слизи, фибрина, элементов нервной ткани.

Наиболее часто встречающимися трехцветными методами являются окрашивание по Маллори и азаном по Гейденгайну. К недостаткам этих методов можно отнести трудоемкость, длительность выполнения многочисленных этапов методик окрашивания, затрату большого количества реактивов. Некоторых недостатков можно избежать, объединяя окраску и протравливание (метод Касона).

Для достижения наилучших результатов окрашивания предпочтительно пользоваться хромовосулемовыми фиксаторами (жидкость Ценкера, ценкерформол); можно перед окрашиванием выдерживать срезы в насыщенном растворе сулемы или 3% растворе бихромата калия – 30 минут.

6.5. Окрашивание по Маллори

Этот метод можно комбинировать с докраской ядер клеток литиевым кармином.

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Обрабатывают раствором Люголя или тиосульфата натрия (этот этап необязателен).
3. Окрашивают 0,5% водным раствором кислого фуксина – 2-3 минуты.
4. Ополаскивают водой (сильно смывает фуксин).
5. Протравливают 1% водным раствором фосфорномолибденовой или фосфорновольфрамовой кислоты – 2-5 минут с последующим быстрым ополаскиванием водой (нельзя пользоваться металлическими инструментами).
6. Окрашивают в смеси: 0,5 г анилинового синего, 2 г оранже G, 100 мл дистиллированной воды. Красящую смесь можно предварительно прокипятить в течение 1-15 минут и охладить.

7. Промывают в дистиллированной воде – до 2 минут.
8. Дифференцируют 96% спиртом до исчезновения фонового окрашивания под контролем микроскопа – около 3-5 минут.
9. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Коллагеновые волокна – темно-синие; ретикулярные волокна, гиалин, амилоид, слизь – голубые; ядра клеток, эластические волокна, глиальные клетки, фибриноид – красные; мышечная ткань, цитоплазма клеток соединительной ткани, эритроциты – оранжевые; миелиновые волокна – желтые.

6.6. Окраска азаном по Гейденгайну

Является модификацией окраски по Маллори. Дает более дифференцированное окрашивание, требует хорошего освобождения материала от остатков фиксатора, при его использовании предпочтительны тонкие парафиновые срезы.

Приготовление красящих растворов

Азокармин готовится следующим образом: 0,1 г азокармина G (при использовании азокармина В можно использовать 0,5-1% растворы) растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Кратковременно кипятят. После охлаждения и фильтрации соединяют с 1 мл ледяной уксусной кислоты.

Второй красящий раствор готовится растворением 0,5 г анилинового синего и 2 г оранже G в 100 мл дистиллированной воды, затем к смеси добавляют 8 мл ледяной уксусной кислоты. После кипячения, охлаждения и фильтрации раствор готов к окрашиванию. Перед использованием его можно разводить в 2-3 раза дистиллированной водой.

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Окрашивают азокармином при 56°C в течение 1-2 часов (режим окрашивания можно подбирать опытным путем, например, предварительно нагревать красящий раствор).

3. Охлаждают в красящем растворе.
4. Ополаскивают дистиллированной водой.
5. Дифференцируют анилиновым спиртом (10% анилиновое масло в 96% спирте) – 10-30 минут под контролем микроскопа.
6. Промывают в уксуснокислом спирте (1% уксусная кислота в 96% спирте) – 1 минута.
7. Ополаскивают дистиллированной водой.
8. Выдерживают в 5% растворе фосфорновольфрамовой кислоты – 2-3 часа.
9. Ополаскивают дистиллированной водой.
10. Окрашивают в смеси анилинового синего с оранжем G – 1-3 часа.
11. Ополаскивают дистиллированной водой.
12. Дифференцируют 96% спиртом под контролем микроскопа (до четкого выявления синих коллагеновых волокон).
13. Просветляют и заключают как обычно.

Результат

Ядра клеток – красные; ретикулярные и коллагеновые волокна – темно-синие; слизь – голубая; мышечная ткань – красно-оранжевая; эритроциты и фибрин – красные.

6.7. Упрощенная трехцветная окраска по Слинченко

Приготовление красящих растворов

Раствор I – 0,2 г хромотропа 2В и 0,5 г йодноватой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Раствор II – 0,2 г водного голубого и 0,1 г йодноватой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Методика окраски

1. Срезы доводят до воды.
2. Окрашивают в рабочем растворе I – 1 минуту.
3. Ополаскивают дистиллированной водой.

4. Выдерживают в 5% растворе фосфорновольфрамовой кислоты – 2-5 минут.
5. Ополаскивают дистиллированной водой.
6. Окрашивают в растворе П – 5-10 минут.
7. Дифференцируют под контролем микроскопа 96% спиртом.
8. Просветляют, заключают.

Результат

Ядра клеток, мышечная ткань, фибрин – красные; гиалин – красно-голубой.

6.8. Метод Масона

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Окрашивают железным гематоксилином Вейгерта (приготовление красящего раствора описано выше) – 5 - 7 минут.
3. Дифференцируют солянокислым спиртом – 15-30 секунд.
4. Промывают водопроводной водой – 10-20 минут.
5. Окрашивают в красящем растворе, содержащем 0,5 г кислого фуксина, 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл дистиллированной воды – 2-5 минут.
6. Ополаскивают дистиллированной водой.
7. Протравливают (до обесцвечивания соединительной ткани при контроле микроскопа) 1% раствором фосфорномолибденовой или фосфорновольфрамовой кислот – 5-15 минут.
8. Окрашивают анилиновым синим (2 г анилинового синего растворяют в 100 мл кипящей дистиллированной воды, добавляют 2,5 мл ледяной уксусной кислоты, охлаждают, фильтруют) – 1-2 минуты.
9. Ополаскивают водопроводной водой.
10. Дифференцируют 1% раствором уксусной кислоты под контролем микроскопа – 10-30 минут.
11. Просветляют, заключают.

Результат

Ядра клеток – черные; коллагеновые и ретикулярные волокна – темно-синие; мышечная ткань – красно-оранжевая; эритроциты и фибрин – красные; слизь – голубая.

6.9. Упрощенный быстрый метод Касона

Приготовление красящего раствора

0,5 г фосфорномолибденовой кислоты, 1 г оранже G, 0,5 г анилинового синего, 1,5 г кислого фуксина последовательно растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Окрашивают железным гематоксилином Вейгерта (см. выше) – 5 минут.
3. Промывают проточной водой – 5-10 минут.
4. Окрашивают рабочим раствором – 5 минут.
5. Промывают проточной водой – 3-5 секунд.
6. Обезживают, просветляют, заключают.

Результат

Ядра – коричнево-черные; коллагеновые и ретикулярные волокна – синие; эластические – розово-желтые; цитоплазма, кератин, эритроциты – красно-оранжевые; фибрин – красный; слизь, амилоид, гиалин – синие.

6.10. Окрашивание коллагеновых волокон фосфорновольфрамовым гематоксилином по Маллори

Этот способ отличается тем, что срезы предварительно протравливаются растворами гетерополикислот. Протрава – это химическое вещество, которое изменяет структуру трудного для окраски субстрата, и формирует связь между ним и красителем при непрямом окрашивании.

После этого протравливания коллагеновые волокна становятся восприимчивыми не только к кислотным, но и основным красителям. Приготовление красящего раствора: в течение нескольких недель выдерживают 0,1 г гематоксилина и 2 г фосфорновольфрамовой кислоты в 100 мл дистиллированной воды.

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Если для фиксации использовались жидкости, не содержащие сулему, то срезы предварительно протравливают ее насыщенным водным раствором при 56°C в течение 3 часов.
3. Выдерживают в 0,5% спиртовом (96%) растворе йода, затем в 0,5% растворе тиосульфата натрия – 5 минут.
4. Промывают водой.
5. Выдерживают в 0,25% растворе перманганата калия – 5 минут.
6. Промывают водой.
7. Обесцвечивают в 5% растворе щавелевой кислоты – 10-15 минут.
8. Промывают водой.
9. Окрашивают фосфорновольфрамовым гематоксилином – до 24 часов.
10. Дифференцируют 96% спиртом, просветляют.
11. Обезвоживают, заключают как обычно.

Результат

Коллагеновые, ретикулярные, эластические волокна – коричнево-желтоватые; ядра клеток, фибрин, миофибриллы – синие.

6.11.Импregnация волокнистых структур соединительной ткани серебром

Группа методов импregnации основана на способности различных по степени зрелости волокнистых структур соединительной ткани восстанавливать и осаждать серебро. Импregnация серебром – сложный и достаточно капризный метод, требующий

высокой квалификации лаборанта и соблюдения ряда условий. При проведении всех этапов нельзя пользоваться металлическими инструментами. Пригодны химически чистые стеклянные инструменты и посуда. Используемая вода должна быть свежей деионизированной (дважды дистиллированной). Реактивы должны быть химически чистыми, свежими. Нитрат серебра - белый, без оттенков. Для импрегнации пригодны парафиновые или замороженные срезы из материала, фиксированного в нейтральном формалине. Можно пытаться импрегнировать материал, фиксированный спиртом, спирт-формалином, жидкостью Ценкера. Продолжительность окраски требует тщательного приклеивания срезов (любыми способами, см. выше). Длительность окрашивания регулируется контролем под микроскопом.

6.12. Импрегнация серебром по методу Фута

Приготовление импрегнирующего раствора: 20 мл 10% водного (только на свежей деионизированной воде) раствора нитрата серебра соединяют с 20 каплями 40% раствора гидроксида натрия. Медленно, при постоянном встряхивании, каплями добавляют 28% раствор аммиака до почти полного растворения коричневого осадка (небольшое количество осадка должно оставаться, так как передозировка аммиака ослабит красящие свойства раствора). Дистиллированной водой доводят объем до 80 мл, фильтруют.

Методика импрегнации

1. Доводят срезы до воды.
2. Помещают в 0,25% водный раствор перманганата калия – на 5 минут.
3. Ополаскивают водой.
4. Выдерживают в 5% растворе щавелевой кислоты до побеления срезов – 15-30 минут.
5. Промывают трижды дистиллированной водой – по 10 минут.

6. Предимпрегнируют раствором нитрата серебра в темноте – 48 часов.

7. Ополаскивают дистиллированной водой.

8. Импрегнируют свежим раствором нитрата серебра до потемнения срезов – 15-30 минут.

9. Ополаскивают дистиллированной водой, контролируя чистоту срезов под микроскопом.

10. Восстанавливают серебро, помещая срезы в 5% нейтральный формалин (концентрацию формалина можно значительно уменьшать, контролируя качество окраски).

11. Промывают водопроводной водой.

12. Тонируют срезы 0,5-1% раствором трихлорида золота – в течение 5-10 минут.

13. Промывают водопроводной водой трижды – по 5 минут.

14. Помещают в 5% раствор тиосульфата натрия – 5 минут.

15. Промывают водопроводной водой, при желании докрашивают ядра квасцовым кармином, обезвоживают, просветляют, заключают срезы.

Результат

Ретикулярные и незрелые коллагеновые волокна, базальные мембраны – черные; зрелые коллагеновые волокна – коричнево-красные; основной фон остальных тканевых структур – желтый.

6.13. Окрашивание эластических волокон методом Унны - Тенцера

Преимуществами этого метода является его простота, быстрота, экономичность, постоянство окраски при разнообразии методов фиксации. К недостаткам можно отнести невысокую избирательность окрашивания, подкрашивание коллагеновых волокон.

Приготовление рабочего раствора красителя

К 100 мл 1% раствора орсеина в 96% спирте добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты.

Методика окраски

1. Доводят срезы до 96% спирта.
2. Окрашивают орсеином при 37°C – до 1 часа.
3. Дифференцируют под контролем микроскопа 1% солянокислым спиртом – 1-3 минуты.
4. Промывают спиртом, обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Эластические волокна – красно-коричневые. Для обзорного анализа хорошо сочетать этот метод с подкрашиванием ядер любым ядерным красителем.

Для одновременного окрашивания различных элементов соединительной ткани можно пользоваться любыми комбинациями описанных выше методов. Так, например, окраску эластина альдегид-фуксином можно комбинировать с трехцветными методами Массона или Маллори. Резорцин-фуксин удачно сочетается с пикрофуксином. Окраску по Ван-Гизону комбинируют с окраской гематоксилином Верхгофа. Гематоксин Верхгофа также хорошо дополняет окраску пикро-пунцовым С. Можно дополнять и методы импрегнации серебром, окрашивая вторым методом после окончания импрегнации.

Следует упомянуть и группу методов изучения структур соединительной ткани, особенно полезных в тех гистологических случаях, когда предполагается выявление ревматических, воспалительных, опухолевых изменений волокнистых структур соединительной ткани. Методы основаны на ферментном переваривании волокнистых структур или полимеров основного вещества соединительной ткани коллагеназами, эластазами, диастазами с последующим окрашиванием соединительной ткани любыми описанными выше способами. При этом патологически измененные участки отличаются от здоровых ослаблением окраски.

Возможности описанных основных методов окраски структур соединительной ткани обобщены в таблице 2.

Тинкториальные свойства волокон соединительной ткани
и мышечной ткани (Д.С. Саркисов, 1996)

Метод	Волокна соединительной ткани						Мышечные ткани
	Зрелые кол- лагеновые	Незрелые коллагеновые	Ретикуляр- ные	Эластиче- ские	Окситала- новые	Эуламино- вые	
Окраска по Ван-Гизону	красные	-	-	-	-	-	желтые
Трехцветные методы окраски	синие	голубые	голубые	-	-	-	красные
Окраска фосфорно- вольфрамовым гематоксилином	красно- коричневые	красно- коричневые	красно- коричневые	желто- коричневые	-	-	синие
Импregnация серебром	+	+++	+++	-	-	-	-
Окраска резорцин- или альдегид- фуксинном	-	-	-	+	+ после окисления	+	-
Окраска орсеином	-	-	-	+	+ после окисления	+	-
Окраска гематок- силином Вергхофа	-	-	-	+	-	-	+—
Реакция с коллагеназой	+	+	+—	-	-	-	-
Реакция с эластазой	-	-	-	+	-	+—	-

Многие способы окраски структур соединительной ткани применимы и для контрастного окрашивания мышечных тканей. Так, например, хорошие результаты дают все трехцветные методы: окраска по Ван-Гизону, фосфорно-вольфрамовым гематоксилином по Маллори. Для специального исследования мышечных тканей (особенно поперечно-полосатых) лучше использовать фиксаторы, содержащие трихлоруксусную кислоту или ценкер-формол. Перед фиксацией желательно добиваться максимального расслабления тканей, только при соблюдении этого условия выявляется исчерченность скелетной и сердечной мышечных тканей.

6.14. Окрашивание гладкой мышечной ткани по Нейберту

Приготовление красящего раствора

80 мл 2,5% ализаринового синего в дистиллированной воде смешивают с 20 мл 10% сульфата аммония в дистиллированной воде, 15 минут перемешивают с использованием мешалки, фильтруют.

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Окрашивают – до 30 минут.
3. Дифференцируют 5% фосфорновольфрамовой кислотой под контролем микроскопа.
4. Ополаскивают водой.
5. Выдерживают в 5% растворе ацетата меди – до 30 минут.
6. Промывают, обезживают, просветляют, заключают.

Результат

Структуры гладкой мышечной ткани – синие.

6.15. Окрашивание сократительного аппарата мышечных клеток леванолом

Приготовление красящего раствора I

В течение 24 часов растворяют 6 г леванола в 90 мл метилового спирта. Перед использованием добавляют 5 мл ледяной уксусной кислоты.

Приготовление красящего раствора II

0,1 г ядерного красного растворяют в 100 мл 5% раствора сульфата аммония, фильтруют.

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Окрашивают раствором I – 5-10 минут.
3. Промывают дистиллированной водой – трехкратно.
4. Выдерживают в 5% растворе таниновой кислоты – 10 минут.
5. Промывают дистиллированной водой – трехкратно.
6. Выдерживают в 1% растворе фосфорномолибденовой кислоты – 10 минут.
7. Промывают дистиллированной водой – трехкратно.
8. Окрашивают раствором II – 5 минут.
9. Промывают раствором метилового спирта с ледяной кислотой в соотношении 9:1 – двухкратно.
10. Обезвоживают метанолом, просветляют, заключают.

Результат

Сократительный аппарат, фибрин, эластин – синие; ядра – красные.

6.16. Быстрый способ полхромной окраски по Н.А. Акимченко

Приготовление красящего раствора

Приготовить раствор, содержащий оранжевый G – 1 г, светлый зеленый – 0,6 г, фосфорно-молибденовую кислоту – 0,5 г, ледя-

ную уксусную кислоту – 1 мл и 100 мл дистиллированной воды. После полного растворения компонентов раствор фильтруется.

Методика окраски

1. Срезы органов, фиксированные в 10% нейтральном формалине, жидкостях Карнуа или Лили и залитые в парафин, доводят до воды.

2. Срезы окрашивают гематоксилином Карацци в течение 5-10 минут.

3. Промывают в проточной воде до посинения срезов.

4. Окрашивают в приготовленной красящей смеси 2-3 секунды.

5. Споласкивают срезы в воде, подкисленной уксусной кислотой.

6. Обезвоживают, просветляют, заключают срезы.

Результат

Ядра клеток окрашиваются в голубой цвет, цитоплазма – в зеленоватый, соединительная ткань – в зеленый цвет, мышечная ткань и эритроциты – желто-оранжевые.



ГЛАВА 7

ОБРАБОТКА И ОКРАШИВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ

Особенности обработки костной ткани диктуются ее высокой плотностью (твердостью). Для забора костной ткани используются пилы. Препараты лучшего качества получаются, если пользоваться ручными пилами. Электрические инструменты используются ограниченно - при большом потоке в практике патологоанатомических отделений. Они значительно повышают температуру в зоне распила, что приводит к формированию посмертных изменений. Большая скорость вращения пилы часто не позволяет точно выпилить необходимый фрагмент. Летящие с большой скоростью мелкие опилки забивают полости губчатой кости.

При работе с пилой необходимо избегать соприкосновения с деревянной поверхностью, так как в распил во время работы могут попасть мельчайшие опилки дерева.

Опухолевидные образования костной ткани, обычно представляющие чередование твердых и мягких участков, можно забирать без значительных повреждений, если предварительно заморозить кость, то есть уплотнить ее мягкие участки.

Фиксация костного материала преследует те же задачи, которые были изложены при описании общих правил фиксации. Предпочтительно использование формалина, который препятствует набуханию коллагена, образующего органическую матрицу кости. Кроме того, формалин, пикриновая и трихлоруксусная кислоты, помимо фиксирующих, обладают и декальцинирующими свойствами. Для фиксации костной ткани можно использовать этиловый спирт, жидкость Карнуа, смеси Суза, Суперформейс, Саномия. Однако хранить материал продолжительно можно лишь в формалине и жидкости Буэна.

Для придания кости мягкости и получения возможности изготовления гистологических срезов, материал необходимо декальцинировать, то есть растворить и извлечь в раствор минеральные вещества.

При декальцинации необходимо придерживаться нескольких основных правил.

1. Продолжительность декальцинации определяется не справочной литературой, а эмпирически.

2. Продолжительность кислотной декальцинации по возможности должна сокращаться, так как это влияет на способность ткани в дальнейшем воспринимать красители. Сократить продолжительность декальцинации можно уменьшением объема исследуемых кусочков, повышением температуры декальцинирующей жидкости до 37°C, перемешиванием раствора декальцинирующей жидкости (1-2 раза в день), удалением из раствора свободного кальция ионообменными смолами, использованием электролиза или ультразвукового воздействия и другими способами.

3. Объем жидкости должен превосходить суммарный объем всех декальцинируемых кусочков в 40-50 раз.

4. Декальцинирующую жидкость необходимо менять 1 раз в 1-2 суток.

5. Материал, содержащий много жира (желтый или красный костный мозг), необходимо предварительно обезжировать.

Мелкие образцы или кусочки, имеющие нежно-ячеистую структуру, можно предварительно залить в целлоидин – это позволит сохранить гистоархитектонику материала.

Различают кислотную и некислотную декальцинацию. Для кислотной декальцинации используют чаще азотную, трихлоруксусную, пикриновую, сернистую кислоты. Продолжительность процедуры - от нескольких часов до нескольких суток. Об окончании декальцинации может свидетельствовать прекращение образования и выделения пузырьков углекислого газа. Для улетучивания углекислого газа емкость, в которой декальцинируются образцы, рекомендуется держать постоянно приоткрытой. Несмотря на простоту и экономичность кислотной декаль-

цинации, она имеет ряд недостатков. Кислая среда неблагоприятно воздействует на клеточные структуры, вызывая в них нехарактерные для прижизненного состояния изменения. Инактивируются многие ферменты, нарушается антигенная структура, что делает практически невозможными гистохимические и иммунохимические исследования. Если задачи исследования предполагают использование таких методик, то предпочтительна бескислотная декальцинация солями этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). ЭДТА и ее натриевые соли (версен, секвестерен, трилон Б, комплексон III) образуют при взаимодействии с солями кальция легко растворимые соединения. При этом не образуется углекислота, повреждающая тканевые структуры, не теряется способность тканей воспринимать красители.

Поскольку продолжительность декальцинации не определяется жесткими методическими рекомендациями, необходимо постоянно тестировать образцы на полноту извлечения соединений кальция. Ориентировочную оценку проводят сгибанием, сжиманием образцов, пробными надрезами или прокалываниями. Более точными являются химические тесты.

7.1. Кальций-оксалатный способ определения степени завершенности декальцинации

1. Отмеряют 3 мл последней порции декальцинирующей жидкости.

2. Каплями добавляют концентрированный аммоний до тех пор, пока раствор не станет нейтральным.

3. Добавляют 5 мл насыщенного раствора оксалата аммония, тщательно перемешивают и оставляют на 30 минут. Появление в жидкости преципитата свидетельствует о большой концентрации в растворе солей кальция и, следовательно, незавершенности декальцинации. Декальцинацию завершают, если по истечении 30 минут после добавления оксалата аммония раствор остается прозрачным.

После декальцинации исследуемые кусочки окончательно моделируют, промывают в воде или щелочных растворах, де-

гидратируют, при необходимости заливают в парафин, целлоидин, целлоидин-парафин или готовят замороженные срезы.

Для окрашивания срезов декальцинированной костной ткани применяют методы, используемые для окраски мягких органов и тканей. Специфичным для костной ткани можно считать метод окрашивания тионином и пикриновой кислотой.

7.2. Окрашивание структур костной ткани тионином и пикриновой кислотой

Красящие растворы

1. Основной раствор – 25% водный раствор тионина. Рабочий раствор – разведенный пополам дистиллированной водой основной раствор, в который перед использованием добавляют раствор аммиака.

2. Насыщенный водный раствор пикриновой кислоты.

Методика окраски

1. Приготовленные после декальцинации срезы промывают дистиллированной водой – 1 минуту.

2. Окрашивают тионином – 5 минут и более.

3. Промывают дистиллированной водой.

4. Выдерживают в насыщенном растворе пикриновой кислоты – 1 минуту.

5. Дифференцируют 70% этиловым спиртом.

6. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Костные клетки – красные; костный матрикс – коричнево-желтый; лакунарно-канальцевая сеть – коричнево-черная.

Широкое распространение заболеваний, сопровождающихся метаболическими изменениями твердых тканей, требует исследования и недекальцинированного материала. Только исследование недеминерализованных костных образований может

выявить очаги остеонидной (неминерализованной) ткани, различить остеопороз и остеомаляцию.

Фиксирующие жидкости для исследования недекальцинированной кости не должны содержать кислот. В качестве заливочной среды используют целлоидин-парафин или синтетические пластические материалы (чаще метилметакрилаты), плотность которых соизмерима с плотностью костной ткани.

7.3. Методика заливки недекальцинированной кости в метилметакрилат по Джауси

1. Кусочки кости фиксируют и дегидратируют в 70% этиловом спирте – 24 часа, затем в 100% этиловом спирте – 12 часов.

2. Для обезжиривания кусочки выдерживают в смеси эфир : ацетон (1:1) – 24 часа.

3. Двукратно выдерживают в 100% спирте – по 6 часов.

4. Пропитывают неполимеризованным метилметакрилатом с добавлением катализатора – 24 часа. Для приготовления заливочной среды мономер метилметакрилата предварительно промывают 5% раствором гидроксида натрия для удаления ингибитора полимеризации – гидрохинона. Затем, из расчета 1г на 200 мл мономера, добавляют катализатор – безводную перекись бензола.

5. Помещают кусочки в ванночки из бумаги или картона, заливают свежей порцией полуполимеризованного метилметакрилата, выдерживают при температуре 35°C – около 2 суток.

Из полимеризованных образцов можно готовить распилы или с помощью специального микротома для резки кости изготавливать срезы. Полученные срезы исследуют после окрашивания или готовят из них гисторентгенограммы.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУР НЕРВНОЙ ТКАНИ



На протяжении многих лет для выявления нервных клеток используют оригинальный и модифицированные методы Ниссля. Эти методы основаны на перекрашивании срезов одним из основных анилиновых красителей с последующей дифференцировкой спиртом. Тела нервных и глиальных клеток имеют более высокое сродство к красителям по сравнению с их отростками. Дифференцировку продолжают под контролем микроскопа до полного исчезновения окраски волокон. Структуры ядер, а также рибонуклеопротеиды, связанные с мембранными органеллами цитоплазмы (гранулярная эндоплазматическая сеть), при этом остаются контрастно окрашенными.

8.1. Метод Ниссля

Одним из основных требований оригинального метода Ниссля является быстрая, исключаящая контакт с водой, фиксация 96% спиртом в течение 4-5 дней.

Специфична и методика получения срезов. Сначала выравнивают поверхность кусочка противоположную плоскости нарезки. На деревянный брусок наносят густой гуммиарабик, в него осторожно вдавливают подготовленный кусочек. Полученный блок на несколько минут переносят в 96% спирт до уплотнения и побеления гуммиарабика. После этого можно начинать приготовление срезов толщиной 10-15 мкм. Срезы собирают и расправляют в 96% спирте и по возможности быстро приступают к окрашиванию. Неиспользованные блоки можно длительно сохранять

в спирте. В оригинальной прописи срезы окрашивают на часовом стекле при осторожном подогревании до появления паров. Красящий рабочий раствор представляет собой смесь 0,38 г метилового синего В, 0,18 г венецианского мыла и 100 мл дистиллированной воды. Для дифференцировки срезы переносят в смесь анилинового масла и 96% спирта в соотношении 1:9. По окончании дифференцировки срезы монтируют на стекла и заключают в канифоль-ксилол, накрывая подогретым покровным стеклом.

Несмотря на высокую специфичность окраски реактивных изменений структур нервных клеток при такой прописи метода, он используется в настоящее время в упрощенных вариантах. Пренебрежение требованиями к спиртовой фиксации, тщательному обезвоживанию, заливки в гуммиарабик или, в крайнем случае, в целлоидин приводит к появлению фонового зеленоватого окрашивания, нестойкости окраски (срезы обесцвечиваются в течение 1-1,5 лет). Вместе с тем оригинальная пропись очень трудоемка, не допускает вариантов в использовании красителей, а при постановке диагноза в условиях практической гистологической лаборатории важна простота метода, его экономичность; в то же время стойкость окраски (до нескольких лет) не требуется.

8.2. Упрощенный метод Ниссля

В качестве красящего раствора используется раствор тионина.

Приготовление красящего раствора

0,2 г тионина растирают в ступке, постепенно добавляя дистиллированную воду (100 мл). Доводят до кипения, тщательно перемешивают (лучше на магнитной мешалке), фильтруют через мелкопористый фильтр.

Методика окраски

1. Собранные в 96% спирте целлоидиновые срезы толщиной 8-10 мкм прогревают до появления пузырьков и охлаждают.

2. Также прогревают и охлаждают срезы в красящем растворе.

3. Промывают дистиллированной водой – двухкратно.

4. Проводят через 96% спирт (под контролем микроскопа до исчезновения фонового окрашивания) – двухкратно. Если фоновое окрашивание не исчезает или дифференцировка ослабляет окраску нейронов, то в спирт можно добавить 1 каплю эвкалиптового масла. Фоновое окрашивание можно ослабить, выдерживая уже изготовленные препараты на свету.

5. Просветляют, заключают срезы.

Результат

Ядра, ядерные структуры нейронов и глиальных клеток, тигроид (вещество Ниссля), клеточные элементы сосудов и мягкой мозговой оболочки, клетки инфильтратов, липофусцин – сине-фиолетовые.

8.3. Упрощенный метод Ниссля (Д.С. Саркисов)

Предлагается использовать материал, фиксированный в спирте и залитый в целлоидин. В своей практике мы получали прекрасную окраску по Ниссля и при формалиновой фиксации, и при заливке в парафин или синтетические смолы.

Методика окраски

1. Парафиновые срезы доводят до воды, целлоидиновые собирают в 70% спирте.

2. Помещают срезы в 0,1% раствор толлуидинового синего или тионина, нагревают до появления паров. Можно окрашивать и без нагревания, но это увеличит продолжительность окраски.

3. Ополаскивают водой.

4. Ополаскивают 70% спиртом.

5. Дифференцируют под контролем микроскопа 96% спиртом.

6. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Структуры ядра, ядрышки, тигроидное вещество (вещество Ниссля), глиальные клетки – сине-фиолетовые. Отростки нейронов не окрашены.

Широко распространенными методами исследования структур нервной ткани являются методы импрегнации и, в особенности, серебром по Гольджи. Кроме оригинального метода, используют многочисленные ускоренные модификации, подробно описываемые в специальных пособиях. В настоящем руководстве мы ограничимся описанием одного метода.

8.4. Ускоренный метод Гольджи

Как и все остальные варианты метода Гольджи, ускоренный способ основан на осаждении в ткани солей серебра. Следует учитывать, что импрегнация выявляет только около 5% клеток. Это, с одной стороны, можно расценивать как достоинство метода. Если бы окрашивались все клетки, срезы были бы однородно черными. С другой стороны, поскольку до сих пор не ясны механизмы селективности окраски, спорным остается вопрос представительности выявляемой популяции клеток.

Методика окраски

1. Кусочки свежезабранной ткани размером около 3x10x10 мм выдерживают в смеси 2,5% бихромата калия и 4% тетраоксида осмия в соотношении 4:1 – 2-7 суток (сроки подбирают опытным путем) при комнатной температуре в темной склянке. Желательно в склянку положить немного стеклянной ваты, чтобы жидкость омывала кусочки со всех сторон. Объем жидкости в расчете на кусочек должен быть не менее 10-15 мл.

2. Кусочки извлекают из склянки, обсушивают фильтровальной бумагой, кратковременно выдерживают в нескольких порциях 0,75% раствора нитрата серебра (до прекращения образования осадка), затем оставляют в этом же растворе в темной склянке при комнатной температуре – на 1-6 суток.

3. Промывают в нескольких сменах 40% спирта – 1-2 часа.

4. Уплотняют в 80% и 96% спиртах.

5. Кусочки прикрепляют гуммиарабиком к блокам, готовят толстые (20-150 мкм) срезы при постоянном смачивании срезов и блока спиртом. Можно предварительно залить кусочки в целлоидин и только потом готовить срезы.

6. Срезы отмывают от избытка серебра 80% спиртом, затем обезвоживают, просветляют, переносят на покровное стекло и заливают густым бальзамом. Нежелательно заключать импрегнированные серебром срезы между двумя стеклами – так они быстро выцветают.

Результат

Нервные и глиальные клетки с отростками – черные.

8.5. Окрашивание миелиновых нервных волокон по Шпильмейеру

Приготовление рабочего раствора

Гематоксилин Бемера. Раствор I: 1 г гематоксилина растворяют в 10 мл 100% спирта. Раствор II: 8 г алюмокалиевых квасцов нагревают в 200 мл дистиллированной воды. Растворы I и II смешивают через 1 сутки и оставляют созревать на неделю. Затем фильтруют и добавляют несколько кристалликов тимола. Перед использованием разбавляют дистиллированной водой в соотношении 3:17

Раствор железоаммонийных квасцов – 2,5% на дистиллированной воде.

Методика окраски

1. Фиксированный в формалине материал режут на замораживающем микротоме.
2. Срезы промывают дистиллированной водой – трехкратно.
3. Монтируют срезы на предметных стеклах.
4. Выдерживают в растворе квасцов в темном месте – 2 суток.
5. Промывают дистиллированной водой.

6. Обезжиривают 96% спиртом (от правильности выполнения этого этапа зависит равномерность окраски, так как необезжиренные участки не воспринимают краситель, создавая эффект пятнистой окраски) – 15-30 минут.

7. Окрашивают разбавленным гематоксилином Бемера на свету – 1 сутки.

8. Промывают в 3-х сменах дистиллированной воды.

9. Дифференцируют в растворе железоаммонийных квасцов под контролем микроскопа (разные виды волокон требуют различной длительности дифференцировки).

10. Промывают дистиллированной водой.

11. Выдерживают в проточной воде – 30 минут.

12. Подсушивают на воздухе, просветляют ксилолом, заключают.

Результат

Миелиновые волокна и ядра олигодендроцитов – сероватосиние.

8.6. Окрашивание по Снесареву

Методика позволяет выявить астроциты белого вещества центральной нервной системы, глиальные волокна, а в нейронах – центральную тинкториальную ацидофилию.

Методика окраски

1. Срезы толщиной 8-10 мкм готовят на замораживающем микротоме из материала, фиксированного 10% формалином.

2. Промывают дистиллированной водой – двукратно.

3. Окрашивают 1% водным раствором эритрозина – 20-30 секунд.

4. Отмывают в нескольких порциях дистиллированной воды до прекращения подкрашивания жидкости.

5. Выдерживают в 0,5% растворе фосфорномолибденовой кислоты (если раствор имеет осадок, его необходимо предварительно растворить инкубацией в течение 2-3 часов при 37-40°C – 30-40 секунд).

6. Промывают дистиллированной водой.
7. Монтируют срезы на стекла, промокают фильтровальной бумагой, смоченной раствором, содержащим 1 часть метилового спирта и 2 части хлороформа.
8. Инкубируют в растворе Май-Грюнвальда – 3-5 секунд.
9. Промывают водопроводной водой, обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Ядро, цитоплазма, отростки астроцитов – голубовато-синие; ядро олигодендроцитов – светло-синие или метахроматичные (с розовым оттенком); ядро и прилежащие к нему часть цитоплазмы, эритроциты – розовые.

8.7. Комбинированный ускоренный метод окрашивания тел нейронов и миелиновых волокон по Викторову

Приготовление рабочих растворов

Раствор люксолевого синего прочного готовят смешиванием 1 г люксолевого синего прочного, 5 мл ледяной уксусной кислоты и 95 мл 96% спирта. В качестве рабочего используют исходный раствор, разбавленный в 100 раз.

Для подкрашивания по Нисслю готовят раствор, содержащий 300-500 мг крезилового фиолетового прочного, 130 мг ацетата натрия, 1,2 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл дистиллированной воды.

Методика окраски

1. Парафиновые срезы доводят до 96% спирта.
2. Окрашивают при температуре 56-60°C раствором люксолевого синего – 1-2 часа.
3. Промывают 96%, 70% спиртом, затем дистиллированной водой.
4. Дифференцируют в 0,1% растворе тетрабората натрия под контролем микроскопа.
5. Споласкивают 5% раствором уксусной кислоты.

6. Окрашивают крезилловым фиолетовым – 2-5 минут.
7. Промывают дистиллированной водой.
8. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Тигроидное вещество, ядра нервных и глиальных клеток, соединительнотканых клеток – фиолетовые; миелиновые волокна – ярко-синие.

8.8. Исследование периферических нервов методом изоляции

Для исследования структур периферических нервов в операционном, биопсийном или экспериментальном материале забирают небольшой фрагмент (например, отрезок седалищного нерва). Не оказывая на него значительного механического воздействия, переносят на сухое предметное стекло. Растягивают кусочек двумя препаровальными иглами до образования тонкой пленки. Для этого одной иглой фиксируют конец кусочка, другой иглой проводят вдоль нерва, разрывая структуры эпиневрия. Препарат заключают в 0,5% осмиевую кислоту и накрывают предметным стеклом. При такой обработке препарат сохраняется непродолжительное время. При необходимости длительно сохранять препарат, осмиевую кислоту отмывают, а препарат, промытый дистиллированной водой, заключают в глицерин-желатин.

Для выявления концевых разветвлений периферических нервов можно взять небольшой кусочек короткой мышцы, расщепить ее на предметном стекле препаровальными иглами, капнуть 1-2 капли 1% уксусной кислоты и накрыть покровным стеклом. Через несколько часов нервные волокна выявляются на фоне мышечных структур.

Для изоляции осевых цилиндров миелиновых нервных волокон образцы помещают в 0,1% раствор хромовой кислоты или 0,2% раствор бихромата калия на 5-8 дней. По истечении этого срока, при расщеплении удастся удалить затвердевшую миелиновую оболочку и при докраске сафранином исследовать осевые цилиндры.



ГЛАВА 9

ОКРАСКА ОРГАНОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ И МАЗКОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

9.1. Окраска по Романовскому-Гимзе

Этот метод на протяжении многих лет остается основным гематологическим способом окраски. Им можно окрашивать срезы органов и мазки (в том числе крови).

Приготовление красящего раствора

Красящий раствор готовят только перед использованием. Образование осадка при приготовлении раствора или при окрашивании делает краситель непригодным для использования. Готовят краситель на свежеприготовленной дистиллированной или деионизированной воде (рН 7,0) из расчета 1-3 капли продажной формы красителя Романовского-Гимза (раствор азура II и эозина в метиловом спирте с глицерином) на 1 мл воды.

Методика окраски срезов

1. Парафиновые, целлоидиновые или криостатные срезы доводят до воды.
2. Оставляют в свежеприготовленном красящем растворе при комнатной температуре на сутки при 37°C – на 1-2 часа.
3. Тщательно промывают водопроводной водой.
4. Дифференцируют в воде, подкисленной ледяной уксусной кислотой (1 капля на 100 мл воды).
5. Промывают водой.
6. Под контролем микроскопа окончательно дифференцируют срезы 96% спиртом.
7. Обезвоживают, просветляют, заключают.

9.2. Методика получения крови, изготовления и окраски мазков

У крупных животных кровь берут из яремной вены с помощью кровопускательных игл. У свиней кровь удобно брать из венозного сплетения глаз. Для этого используют шприц, емкостью 20 мл, иглы № 12-30. Животное фиксируют и вводят иглу по внутреннему углу костной орбиты к противоположному уху до упора иглы, затем оттягивают на 1-1,5 см и набирают кровь. Скол иглы должен быть направлен к костной орбите, иначе мягкие ткани глаза закроют отверстие иглы и кровь поступать не будет. У лабораторных животных кровь получают из сердца или периферических сосудов.

Для приготовления мазков крови используют свежую кровь и чистые обезжиренные стекла. На один конец предметного стекла помещают каплю крови. Слева от капли под углом 45° ставят шлифованное стекло. После соприкосновения капли и стекла ожидают, когда капля расплывется под гранью шлифованного стекла. Затем, движением справа налево растягивают (не размазывают!) каплю. После просушивания мазок фиксируют в метиловом или 96° этиловом спирте – 3-15 минут, высушивают.

Окрашивают только свежеприготовленным красителем – 15-30 минут, промывают дистиллированной водой, просушивают. При необходимости можно заключать окрашенные мазки в бальзам после тщательного высушивания.

Результат

Ядра клеток – интенсивно синие; цитоплазма лимфоцитов, тромбоцитов, моноцитов – голубая; зернистость – темно-фиолетовая или красно-оранжевая, в зависимости от разновидности лейкоцитов; эритроциты – розово-оранжевые.

Для быстрого и достоверного микроскопического анализа полученных мазков предпочтительно пользоваться масляно-иммерсионными объективами

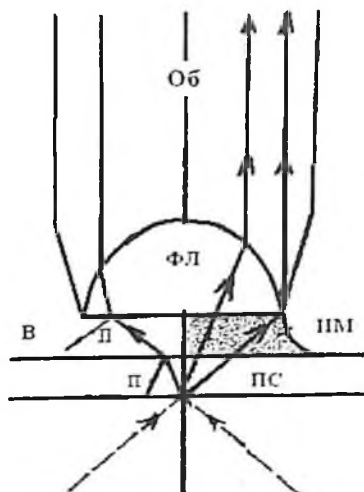


Рис.16. Масляно-иммерсионный объектив.
*Об – объектив, ФЛ - фронтальная линза, В – воздух,
 ИМ - иммерсионное масло, ПС - покровное стекло.*

Масляно-иммерсионный объектив (рис.16) – это специальный стеклянный объектив, погружаемый в каплю иммерсионного масла на покровном стекле. Иммерсионное масло имеет тот же показатель преломления, что и стекло. Такой объектив позволяет использовать все лучи света, проходящие через фронтальную линзу, без преломления, то есть без потери освещенности, которая бывает всегда, когда между линзой и покровным стеклом содержится воздух.

9.3. Окраска азур II – эозином

Отличием этого метода от способа Романовского-Гимзы является то, что для приготовления красящего раствора используют эозин, растворенный в воде. Основные растворы при этом хорошо хранятся (но только в темноте), менее капризны в отношении качества воды, менее склонны к осадкообразованию.

Приготовление красящего раствора

Основные растворы готовят растворением 1 г азур II и эозина (в отдельных склянках) в 1000 мл дистиллированной воды. Хранят до нескольких месяцев в темноте.

Необходимое количество красящего раствора разводят перед использованием. Для этого смешивают 12 мл раствора эозина, 90 мл дистиллированной воды и 10 мл раствора азур II. Осторожными покачиваниями перемешивают смесь и контролируют осадкообразование. Краситель с осадками непригоден для использования.

Методика окраски та же, что и по Романовскому-Гимзе.

9.4. Окраска пиридин-эозин-азуром по Алфеевой

Лучшие результаты дает фиксация материала в формалине или ценкер-формоле с последующей заливкой в целлоидин.

Приготовление красящего раствора

Смешивают 13 мл 0,1% водного раствора желтого эозина, 5 мл 0,1% раствора азур II и 7 мл дистиллированной воды. Добавляют 6 капель чистого пиридина (для протравы). Краситель остается пригодным в течение нескольких дней. Соотношение составных частей красителя можно подбирать опытным путем в зависимости от получаемой окраски.

Методика окраски

1. После извлечения целлоидина срезы собирают в 70% спирте.
2. Промывают дистиллированной водой – 2-3 минуты.
3. Выдерживают в 0,23% растворе марганцовокислого калия – 15 минут.
4. Ополаскивают дистиллированной водой.
5. Выдерживают в 5% растворе щавелевой кислоты – 5 минут.
6. Промывают в дистиллированной воде – 20 минут.
7. Окрашивают пиридин-эозин-азуром – 4-27 часов (продолжительность окраски подбирают эмпирически).

8. Ополаскивают дистиллированной водой.
9. Дифференцируют водой, подкисленной уксусной кислотой под контролем микроскопа.
10. Ополаскивают водой.
11. Окончательно дифференцируют в 96% спирте до того момента, когда новая порция спирта не перестанет подкрашиваться в синий цвет.
12. Быстро обезвоживают, просветляют, заключают.

Большим шагом вперед в лабораторной технике гематологических исследований является создание и практическое использование автоаналитических аппаратов. Они имеют ряд преимуществ перед ручными методами: высокую производительность, экономичность, легкость применения и безостановочность в работе. Созданы полностью автоматические линии, позволяющие быстро и точно проводить гематологические исследования сразу по нескольким параметрам («Техника», SMA-4, SMA-7, Hemalog D, «Культер» - D:ff-3). Например, прибор «Культер» модель D:ff-3 классифицирует 10 видов лейкоцитов, дает количественную оценку морфологических особенностей эритроцитов (величину, окраску, форму), оценивает число и отклонения от нормы содержания в крови тромбоцитов. Исследование морфологических параметров производится в окрашенных мазках крови при помощи бинокулярного микроскопа с автоматической фокусировкой. На проведение 14 анализов требуется примерно 20 минут, в течение этого времени прибор не требует участия лаборанта.



ГЛАВА 10

ОСНОВНЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСУДИСТОГО РУСЛА

10.1. Инъекционные методы исследования сосудистого русла

Одной из основных методик изучения архитектоники сосудов разного калибра является инъекция красителей. Перед инъекцией красящей массы сосуды предварительно промывают физиологическим раствором, физиологическим раствором с добавлением гепарина, буферными или другими растворами.

Инъекция красителя может быть выполнена интрасосудисто, интракардиально или внутрикостно. В зависимости от дисперсности красящей массы можно добиться избирательного заполнения артериального, венозного или микроциркуляторного русел. Инъекция может быть осуществлена по току крови – антеградно, или против тока крови – ретроградно. Инъекцию можно проводить прижизненно или посмертно.

10.1.1. Характеристика инъекционных масс для просветленных препаратов

Инъекция может быть произведена «холодными» застывающими массами, использование которых основано на затвердении жидких масс при диффузии и испарении воды или летучих, растворяющих массу веществ (эфира, органических растворителей). В качестве инъекционной массы можно рассматривать кровь, которая после остановки сердца задерживается в сосудах и свертывается. Одним из наиболее широко используемых веществ для наливки является тушь, обычно в водных растворах.

Для инъекции микрососудистого русла часто используют соли серебра (0,1-4,0% растворы нитрата серебра). Для получения более информативных препаратов микрососудистого русла процесс восстановления металлического серебра в налитых сосудах стимулируют кварцеванием, рентгеновским излучением, облучением солнечными лучами. В дальнейшем препарат фиксируют в 5-10% растворе нейтрального формалина, обезвоживают в спиртах, просветляют и заключают в бальзам.

В качестве инъекционной массы можно использовать взвесь свинцового сурика (свинцовых белил) например, по прописи Б.В.Огнева (1950) (свинцовые белила – 15 г, вода – 250 мл).

Инъекционная масса с берлинской лазурью по прописи Робина (1952) готовится из двух растворов: А – 90 мл насыщенного водного раствора ферроцианида калия и 50 мл глицерина; раствор Б – 3 мл (30%) официального раствора хлорного железа и 50 мл глицерина. Растворы А и Б медленно смешивают, добавляют несколько капель соляной кислоты, а затем разводят в трех объемах одного из растворителей желатина при температуре 45-50°C.

Некоторые гистологические красители, используемые при окраске гистологических срезов (гематоксилин, метиленовый синий, альциановый синий и др.) так же могут быть использованы как массы для заполнения и окраски сосудистого русла.

Лучшие результаты удается получать при использовании растворов низкомолекулярных активных красителей (проционовые красители). В отличие от обычных красителей они химически взаимодействуют с субстратом, присоединяясь к нему посредством прочных ковалентных связей. Присоединившиеся к субстрату молекулы красителя не извлекаются органическими растворителями и полностью сохраняются даже при длительной промывке водными растворами. Самыми реакционноспособными в настоящее время являются дихлортриазиновые проционовые красители (проционовый ярко-голубой RS).

Большую группу составляют инъекционные массы на основе масляных красок. Для их приготовления применяют летучие органические растворители. Массы Teichmann (1861) готовятся в следующем составе:

1. Красная смесь: мел – 500 г, киноварь – 100 г, льняное масло – 100 г, сернистый углерод, эфир или бензин – 50-150 г.

2. Синяя смесь: окись цинка – 150 г., ультрамарин – 10 г, льняное масло – 20 г., сернистый углерод, эфир или бензин – 10 г.

3. Белая смесь: окись цинка – 250 г, льняное масло – 30 г, сернистый углерод, эфир или бензин – 20 г.

Для инъекции кровеносных сосудов могут быть использованы горячие массы, которые готовятся из нелетучих веществ, вследствие чего слепок получается без последующего изменения объема, в чем и заключается основное преимущество этого метода наливки. Чаще всего для этих целей используют смеси желатина и подобных ему веществ.

10.1.2. Характеристика инъекционных масс для коррозионных препаратов

Одним из старых методов изучения сосудистого русла является коррозионный метод, основанный на наливке сосудов застывающими кислото- и щелочноустойчивыми «холодными» и «горячими» массами с дальнейшим вытравливанием или разрушением тканей гниением, или концентрированными растворами кислот и щелочей, в результате чего остается слепок сосудов органа. Коррозионный метод позволяет наиболее полно, в объемных взаимоотношениях изучать компоненты сосудистого русла.

Для изготовления коррозионных препаратов используются чаще пластмассы на основе эфиров метакриловой кислоты, в частности, метилметакрилат, полиметилметакрилат. Эти соединения принадлежат к группе акриловых соединений и представляют собой жидкость с характерным сладковатым запахом. Они способны под влиянием тепла, света и катализаторов переходить в твердое состояние – плексиглас (органическое стекло). Существуют модификации данных методик, позволяющие после добавления в жидкую смесь пластификаторов получать эластичные нехрупкие продукты.

Быстрое развитие ортопедической стоматологии позволяет использовать и зубоорудительные пластмассы (АКР-7, АКР-9, АСТ-2, АСТ-4).

Полиэфирные смолы СКПС – 2 и СКПС – 2А, также используемые для инъекций, представляют собой растворы ненасыщенных полиэфиров молекулярного веса 1000-2000 в мономерах, способных к полимеризации. Указанные смолы прозрачны, легко окрашиваются тушью и анилиновыми красителями в различные цвета. Обладают низкой вязкостью.

Для изготовления коррозийных препаратов пользуются целлоидном. Целлоидиновые массы окрашиваются кислотоустойчивыми красителями (судан, ультрамарин). К числу холодных масс относятся целлоидин с камфарой, целлулоид, растворенные в ацетоне.

10.2. Беспрепаровочные методы визуализации инъецированных сосудов (В.Н.Горчаков, 1997)

На протяжении длительного времени наиболее популярным анатомическим методом исследования сосудов остается препарирование. Усовершенствование способов наливки сосудистого русла, при которых используются специальные инъекционные массы, облегчило процесс препаровки. Однако, метод механической препаровки, более приемлимый для крупных сосудов, оказывается недостаточным при выявлении мелких сосудов из-за нарушения их целостности и неизбежности появления артефактов. Это послужило толчком к разработке беспрепаровочных методов визуализации инъецированных сосудов. Широкое распространение получили методы просветления, коррозии, рентгенографии.

10.2.1. Методики просветления препаратов

Просветление делает препараты прозрачными, проходимыми для лучей света. Различают две группы просветляющих веществ в зависимости от того, способны ли они просветлять пре-

параты сразу после извлечения их из воды или только после обезвоживания спиртом.

Первую группу составляют глицерин, глицерин-желатина, насыщенный раствор уксуснокислого калия, жидкость Фарранта, масса Апатии.

Ко второй группе просветляющих веществ можно отнести ксилол, толуол, эфирные масла, анилиновое масло, скипидар.

Метод просветления складывается из следующих этапов: фиксация, беление, промывка, обезвоживание, просветление, заключение. Для фиксации используют спирт, формалин, другие фиксаторы, соответствующие целям и задачам исследования. Для беления употребляют пергидроль и перекись водорода. После беления препарат промывают несколько раз в проточной воде, а затем выдерживают в течение 2 суток в дистиллированной воде. Для последующего обезвоживания применяется этиловый спирт в возрастающих концентрациях: 60%, 75%, 85%, 96%, 100%. Просветление существенно улучшает оптические свойства препаратов. Наиболее часто в морфологической практике для просветления используют ксилол, толуол, бергамотовое или гвоздичное масла, бензоил. Небольшие объекты просветляются в течение 1-6 часов, более крупные – 3-7 дней. Для заключения используют канадский или пихтовый балзамы, помещаемые под покровное стекло или полистирол.

10.2.2. Способы коррозии инъецированных препаратов

На органах с налитой сосудистой системой путем препаровки осуществляется удаление окружающих тканей. Методом препаровки удается легко выделить крупные и частично мелкие кровеносные сосуды. Значительная часть коллатеральных и анастомозирующих сосудов при этом разрушается. Поэтому препаровка применяется как предварительный этап при приготовлении препаратов.

Биологические методы коррозии. Первые методики биологической коррозии основывались на разрушении мягких тканей личинками жуков. Существуют биологические методы, при которых вытравливание идет за счет гниения, однако, это требует

много времени и сопровождается неприятным запахом. Можно сочетать коррозию посредством гниения с вытравливанием кислотой. По Ромодановскому (1959) орган помещается в теплую воду, подвергается варке при незначительном кипении, после полного разваривания, остатки мягких тканей удаляются тонкой струей воды.

Кислотные методы основаны на вытравливании паренхимы органа растворами кислот или щелочей. Слепок сосудистой системы, изготовленный из щелоче- или кислотоустойчивых инъекционных масс остается при этом неповрежденным. Разрушение мягких тканей можно проводить в растворах соляной кислоты возрастающей концентрации (30%, 60%, 90% последовательно), при необходимости ускорения процесса, коррозию можно проводить в термостате при температуре 30-36°C. Вместо кислот можно использовать 15-40% растворы едкой щелочи.

По извлечению препарата из корродирующего раствора он промывается для удаления остатков тканей. При этом обнажается сосудистое русло. Препарат высушивается, после этого его монтируют на подставке и хранят под стеклянным колпаком. Реже коррозийный препарат помещают в жидкость для хранения.



ГЛАВА 11

ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ

Целью гистохимических исследований является выявление тканевой локализации различных химических соединений. Эти методы гораздо менее специфичны по сравнению, например, с иммуноцитохимическими, однако, отличаются простотой выполнения и дешевизной используемых реактивов.

Подготовка материала к гистохимическому исследованию включает традиционные этапы забора материала, фиксации, промывки, обезвоживания и заливки в плотные среды. Методика и особенности проведения каждого этапа зависят от выбора исследуемых соединений и направлены на одновременную сохранность прижизненного состояния тканевых структур и выявляемых веществ.

11.1. Гистохимия белковых соединений

Белки принимают участие в построении практически всех структур клеток и тканей. Для гистохимии представляет интерес не подтверждение наличия белков в тех или иных клеточных и тканевых структурах, а оценка его содержания или установление класса белка. Гистохимические методы позволяют устанавливать тканевую локализацию различных аминокислот и косвенным путем оценивать структурное распределение белков в целом.

11.1.1. Окрашивание суммарного белка по Бонхегу

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Окрашивают 0,05% раствором бромфенолового синего, содержащим 2% уксусной кислоты и 1% сулемы.
3. Отмывают 0,5% раствором уксусной кислоты в течение 5-15 минут.
4. Переносят в дистиллированную воду – на 20 минут.
5. Быстро обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Белки окрашиваются в темно-синий цвет.

11.1.2. Реакция тетразониевого сочетания по Даниели

Этот метод основан на взаимодействии некоторых амнино-кислот, таких как тирозин, триптофан и гистидин с тетразотированным бензидином и последующем сочетании свободной диазогруппы с β -нафтолом.

Приготовление рабочего раствора тетразотированного бензидина

18 мл бензидина смешивают с 50 мл дистиллированной воды, добавляют 0,83 мл концентрированной соляной кислоты. Охлаждают на льду, добавляют смесь 1 мл дистиллированной воды с 14 мг нитрита натрия, тщательно перемешивают (лучше на мешалке), доводят гидроксидом Na или K до pH 9,0. Полученный коричневый раствор не хранится.

Методика окраски

1. Срезы доводят до дистиллированной воды.
2. Промывают в веронал-ацетатном буфере (pH 9,2).
3. На холоде окрашивают свежеприготовленным тетразотированным бензидином – 20 минут.

4. Промывают дистиллированной водой.
5. Промывают подкисленной (0,1 N соляная кислота) водой.
6. Промывают дистиллированной водой.
7. Проводят реакцию азосочетания в веронал-ацетатном буфере (рН 9,2), насыщенном β-нафтолом - 15 минут.
8. Промывают 1% уксусной кислотой.
9. Промывают дистиллированной водой.
10. Быстро обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Белковые соединения окрашиваются в красно-коричневые тона.

11.1.3. Реакция Миллона в модификации Бейкера

Этот метод позволяет выявлять структуры, содержащие в своих белковых соединениях тирозин. Качество окраски не обусловлено использованием специфичного фиксатора, допустима традиционная фиксация формалином.

Методика окраски

Приготовление жидкости Миллона. При нагревании растворяют 10 г сульфата ртути в 100 мл 10% серной кислоты. После охлаждения объем раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой. Перед использованием раствор нагревают до кипения и добавляют 20 мл 0,25% раствора нитрата натрия.

1. Срезы доводят до воды.
2. В термостойкой емкости окрашивают нагретой до кипения жидкостью Миллона.
3. В течение нескольких минут охлаждают до комнатной температуры.
4. Промывают дистиллированной водой – трехкратно по 2 минуты.
5. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Структуры, содержащие в составе белковых единиц тирозин, окрашиваются в красно-желтые тона. Интенсивность окраски пропорциональна количеству выявляемой аминокислоты.

11.1.4. Методика выявления сульфгидрильных групп, связанных с белком, по Барриетту-Зелигману

Многие патологические процессы в организме связаны с повышением интенсивности перекисного окисления липидов. Состояние резервных сил при этом можно оценивать по содержанию структур, имеющих сульфгидрильные (SH=) и дисульфидные (-S-S-) группы.

Методика основана на избирательном окислении тиоловых групп белков дисульфидами в щелочной среде. При этом образуется нерастворимый в воде и органических растворителях комплекс, способный преобразовываться в азокраситель сочетанием с солью диазония. Желательна фиксация 1% трихлоруксусной кислотой в 80% спирте, жидкости Карнуа, формалине. Быстрая заливка в парафин уменьшает нежелательное окисление SH-групп.

Методика окраски

1. Доводят срезы до воды.
2. Инкубируют при 50°C с ДДД-реагентом (50 мг 2,2-диокси-6,6-динафтилдисульфида смешать с 30 мл 100% спирта и 70 мл натрий-вероналового буфера, pH 8,5) – 1 час.
3. Охлаждают до комнатной температуры.
4. Промывают дистиллированной водой, затем дистиллированной водой – двухкратно по 10 минут, подкисленной до pH 4,0-4,5 уксусной кислотой.
5. Обезвоживают, промывают эфиром.
6. Вновь доводят до воды по схеме.
7. Окрашивают 0,1% раствором тетразотированного диортоанизида в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4 – в течение 2 минут.

8. Промывают водой.
9. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Структуры, содержащие активные SH-группы окрашиваются в синий цвет, снижение активности и концентрации SH-групп в белковых структурах проявляется красным окрашиванием.

11.2. Гистохимия нуклеопротеидов

В тканях животных и микроорганизмах присутствуют 2 типа нуклеиновых кислот – дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК). Молекулы ДНК и РНК представляют собой высокомолекулярные полимеры, структурно-функциональной единицей которых являются мононуклеотиды. Гистохимически нуклеопротеиды можно выявить, контрастируя составные части мононуклеотидов – пуриновые и пиримидиновые основания, углеводный компонент, фосфорную кислоту.

11.2.1. Выявление ДНК и РНК по Браше

Поскольку этот метод не является высокоспецифичным как, например, иммуоцитохимический, желательна постановка контролей. Участки тканей, контрастируемые по Браше после инкубации, например, с рибонуклеазами или дезоксирибонуклеазами, остаются неокрашенными, в отличие от серийных участков, не подвергавшихся прединкубации.

Приготовление рабочего красящего раствора

12,5 мл 2% пиронина GS смешивают с 7,5 мл 2% метилового зеленого и 30 мл дистиллированной воды.

Методика окраски

1. Срезы доводят до воды.
2. Выдерживают в красящем растворе около 6 минут.

3. Дифференцируют Н-бутанолом – дважды по 5 минут.
4. Просветляют, заключают в бальзам.

Результат

Структуры, содержащие ДНК – зеленовато-голубые; содержащие РНК – красные.

11.3. Гистохимия углеводов

В организме углеводы выполняют опорные и энергетические функции. Углеводы являются составными частями АТФ, цАМФ, нуклеиновых кислот и других биологически важных соединений. Являясь специфическим компонентом иммуноглобулинов, углеводы участвуют в иммунных реакциях организма. Продукты расщепления углеводов используются для синтеза всех классов соединений в живой клетке.

Выявление углеводов основано на методах общего анализа химических групп. Для этого применимы методы окисления, метахроматического окрашивания основными красителями, реакции блокирования и превращения реактивных групп, реакции связывания коллоидных металлов.

11.3.1. ШИК – реакция

Этим методом выявляют соединения, содержащие оксигруппы, которые в результате окисления метайодной кислоты могут превращаться в альдегидные группы. Однако в срезах с помощью ШИК-реакции выявляются лишь гликоген и гликопротеины.

Для получения лучших результатов желательно пользоваться химически чистой посудой, исключить контакт срезов с металлическими инструментами.

Приготовление реактива Шиффа

0,5 г парарозанилина (стандартный, свободный от акридина парафуксин) растворяют в 15 мл 1N соляной кислоты при по-

стоянном помешивании. Добавляют 69-70 мл дистиллированной воды, содержащей 0,5 г пиросульфата калия. Полученный насыщенно-красный раствор плотно закрывают и оставляют при комнатной температуре в темном месте на 24 часа. В течение этого времени раствор приобретает желтоватый оттенок. После этого раствор тщательно размешивают с 0,3 г порошка активированного угля и дважды фильтруют.

Методика окраски

1. Депарафинированные срезы доводят до воды.
2. Проводят окисление 0,5-1% водным раствором орто- или метайодной кислоты – 2-10 минут. Продолжительность этого этапа и концентрация окислителя подбираются эмпирически.
3. Промывают водой – 10 минут.
4. Инкубируют в реактиве Шиффа, при комнатной температуре - 10-30 минут. Этап проводится в темноте!
5. Промывают трижды сернистой водой – по 2 минуты. Для ее приготовления к 100 мл дистиллированной воды прибавляют 5 мл 10% пиросульфата калия и 5 мл 1N соляной кислоты.
6. Промывают в нескольких сменах проточной, а затем дистиллированной воды.
7. При необходимости докрашивают ядра (см. выше).
8. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Структуры, содержащие гликоген – темно-красные; содержащие гликопротеины – красно-лиловые. Гликоген можно дифференцировать от гликопротеинов перевариванием амилазой или диастазой.

11.3.2. Метакроматическое окрашивание гликозаминогликанов

Метакромазия – это изменение спектров поглощения красителей в тканях. Примером метакромазии является окрашивание тиазиновыми красителями гранул тучных клеток в фиолетово-красные цвета, в то время как другие структуры этих клеток

окрашиваются в оригинальный синий цвет красителя. Метахроматически окрашиваются, как правило, кислые гликозаминогликаны.

На интенсивность метахроматического окрашивания влияют все воздействия (химические, термические, механические), которым подвергается материал на всех этапах подготовки ткани к окрашиванию. Лучшего качества получаются препараты из криостатных срезов с непродолжительной последующей фиксацией.

Практически для получения метахромазии используют только красители триазиновой группы в водных растворах. К ним относят толуидиновый синий, метиленовый синий, азур А, тионин, основной фуксин. Окраску проводят по обычным методикам простого прогрессивного окрашивания. Тканевые структуры, содержащие гликозаминогликаны, приобретают все оттенки от синего через фиолетовый, до красного.

11.3.3. Выявление кислых гликозаминогликанов с помощью коллоидных металлов (реакция Хейла)

С этой целью используют коллоидные растворы золота, железа, платины, тория.

В кислой среде ($\text{pH} < 2$) коллоидное железо соединяется с карбоксильными и сульфоновыми группами гликозаминогликанов. Места связывания на последующих этапах выявляются в реакции берлинской лазури. Следует учитывать, что при повышении pH растворов коллоидный гидроксид железа начинает связываться не только с гликозаминогликанами, но и с белками и нуклеиновыми кислотами.

Методика окрашивания

1. Срезы доводят до воды.
2. Готовят коллоидное железо. Для этого 25 мл кипящей дистиллированной воды смешивают с 4 мл 32% раствора трихлорида железа. Полученный раствор хранится около месяца. Для окрашивания срезы помещают на 10 минут в раствор, со-

держаний 10 частей приготовленного красителя и 4 части ледяной уксусной кислоты.

3. Промывают в 5% уксусной кислоты - дважды по 5 минут.
4. Инкубируют срезы в растворе, содержащем 1 часть 25% гексацаноферрата калия и 2 части 1% соляной кислоты.
5. Промывают дистиллированной водой – дважды по 2 минуты.
6. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Структуры, содержащие кислые гликозаминогликаны – синие.

11.3.4. Окраска альциановым синим

Альциановый синий относится к фталоцианиновым красителям. Эта группа красителей включает в себя разновидности альцианового синего – 8G, 8S, 8GS, 5G, альцианового зеленого – 2G, 3B, кроме того, люксолевый прочный синий, астрасиний. Альциановый синий интересен тем, что можно проследить параллель между окрашиванием альциановым синим и метахромазией при изменении pH и концентрации красителя. Кроме того, альциановый синий отличается простотой применения и быстротой окрашивания.

Окраска альциановым синим при pH 2,5

1. Срезы доводят до воды.
2. Окрашивают в 1% растворе альцианового синего 8G на 3% уксусной кислоте (pH 2,5) – 30 минут.
3. Промывают проточной водой – 5 минут.
4. Обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Слабокислые сульфатированные гликозаминогликаны и гликопротеины – темно-синие. Сильнокислые сульфатированные гликозаминогликаны не окрашиваются.

Окраска альциановым синим при рН 1,0

Методика окраски та же, но в качестве красящего используют 1% раствор альцианового синего 8G в 0,1 N соляной кислоте (рН 1,0). Окрашиваются только сульфатированные гликозаминогликаны.

11.3.5. Окраска метиленовым синим

Метиленовый синий позволяет отличать места распределения кислых гликозаминогликанов и нейтральных гликопротеинов, дифференцировать сульфатные, фосфатные, карбоксильные группы, выявляя базофилию при различных рН. Степень базофилии определяется наличием свободных анионов полисахаридов. По мере снижения рН интенсивность окрашивания отдельных структур снижается. Это явление носит название «экстинкция» (от лат. Extinctio – гашение).

Окрашивание анионных групп метиленовым синим при различных значениях рН

рН	Окрашиваемые группы или вещества
1,5	SO_4
2,8	$PO_4(SO_4)$ кислые гликозаминогликаны
4,0	$COOH (PO_4, SO_4)$
5,0	все кислые группы
>5,0	нейтральные гликопротеины

Для определения экстинкции метиленового синего можно использовать 0,1-0,01% его растворы в веронал-ацетатном буфере или ацетатном буфере Михаэлиса при различных значениях рН.

11.3.6. Окраска кармином по Бесту

Этот метод позволяет избирательно выявлять тканевую локализацию гликогена. Он применим в тех случаях, когда задачи исследования требуют дифференцировки распределения глико-

гена и других ШИК-положительных продуктов (мукопротеидов, гликопротеидов). Механизм избирательности окрашивания кармина окончательно не выяснен, поэтому при использовании этого метода необходимо проводить контроли с перевариванием гликогена амилазой, диастазой или слюной.

Приготовление красящего раствора кармина

2 г кармина, 1 г карбоната калия, 5 г хлорида калия кипятят в 60 мл дистиллированной воды несколько минут. После охлаждения раствор фильтруют и добавляют в него 20 мл раствора аммиака. При температуре +4°C раствор хранится около 3 месяцев. Для приготовления рабочего красящего раствора 2 мл маточного раствора соединяют с 3 мл аммиака и 3 мл метанола.

Методика окраски

1. Материал фиксируют по Лилли, Жандру, Карнуа, Шабашу, Буэну или в 100% спирте. Заливают в парафин, целлоидин или готовят замороженные срезы.
2. Срезы доводят до 100% спирта.
3. Целлоидинируют срезы в 1% растворе целлоидина, приготовленном на смеси спирта и эфира в соотношении 1:1 – 2 минуты.
4. Просушивают срезы.
5. Уплотняют в 70% спирте, собирают в дистиллированной воде.
6. Подкрашивают ядра гемалауном или гематоксилином Эрлиха.
7. Промывают дистиллированной водой.
8. При необходимости дифференцируют в солянокислом спирте и снова промывают.
9. Окрашивают кармином – 10-30 минут.
10. Дифференцируют до окончания подкрашивания раствора смесью, содержащей 4 мл метанола, 5 мл 100% этанола, 10 мл дистиллированной воды.
11. Промывают в 80% спирте, обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат

Ядра – темно-синие; гликоген – красный.

11.4. Гистохимия липидов

Липиды – жиры и жироподобные вещества - это преимущественно неполярные соединения, основным компонентом которых являются жирные кислоты. С учетом гистохимических свойств липиды делят на простые (нейтральные жиры, воски, стероиды) и сложные (фосфолипиды, цереброзиды, ганглиозиды, сульфолипиды).

Липиды нерастворимы или плохо растворимы в воде, хорошо растворяются в хлороформе, ацетоне, эфире, нагретом спирте. Способность липидов в большей или меньшей степени растворяться в жирорастворителях положена в основу дифференциальной экстракции липидов и выявления их с помощью жирорастворимых красителей. Химические способы выявления липидов основаны на определении их активных функциональных групп.

11.4.1. Окраска суданом черным по Лизону

1. Материал фиксируют в кальций-формоле, готовят срезы на замораживающем микротоме.
2. Промывают срезы в 70% спирте.
3. Окрашивают насыщенным профильтрованным раствором судана в 70% спирте – 20-30 минут.
4. Промывают в 70% спирте – 30 секунд.
5. Промывают дистиллированной водой.
6. Окрашивают 1% ядерным прочным красным – 1 минуту.
7. Быстро промывают в дистиллированной воде, заключают в глицерин-желатин или глицерин.

Результат

Липиды окрашиваются в темно-синий до черного цвета; ядра – красные.

11.4.2. Окраска масляным красным О по Лили

1. Замороженные срезы переносят в дистиллированную воду.
2. Быстро промывают 60% изопропанолом.
3. Окрашивают масляным красным О – 10 минут. Для приготовления красящего раствора 0,05 г масляного красного О растворяют в 100 мл 98% изопропанола, разводят дистиллированной водой в соотношении 6:4, выдерживают 24 часа, фильтруют.
4. Дифференцируют 60% изопропанолом.
5. Промывают дистиллированной водой.
6. Заключают в глицерин-желатин.

Результат

Нейтральные жиры окрашиваются в красный цвет; ядра клеток – синие.

11.4.3. Окраска фосфолипидов кислым гематеином Бейкера

Фиксированные в кальций-формоле кусочки выдерживают в бихромат-кальциевой смеси, в результате чего фосфолипиды образуют нерастворимые комплексы с хромом. Эти комплексы, взаимодействуя с кислым гематеином, образуют соединения хром-гематеин, выявляемые по темно-синей окраске.

Приготовление красящего раствора кислого гематеина

50 мг кристаллического гематоксилина растворяют в 50 мл 0,1% раствора метайодата натрия нагреванием до кипения. После охлаждения добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты.

Методика подготовки материала к окраске

1. Материал фиксируют в 0,05% растворе хлорида магния в ацетоне, дважды меняя раствор – 2 часа.

2. Промывают ксилолом – двукратно по 5 минут.
3. Инкубируют в расплавленном парафине – 2 смены по 5 минут.
4. Заливают в парафин, готовят срезы.
5. Депарафинируют ксилолом – 2 смены по 5 минут.
6. Выдерживают в 0,65% хлорида магния в ацетоне – дважды по 5 минут.
7. Промывают дистиллированной водой – дважды по 1 минуте.
8. Помещают срезы в 5% раствор бихромата калия при 60°C – на 4 часа.
9. Промывают дистиллированной водой – трижды.
10. Окрашивают кислым гематеином при температуре 37°C – 1-5 часов.
11. Дифференцируют в 0,25% водных растворах дибората натрия декагидрата и гексацианоферрата калия – 18 часов.
12. Промывают дистиллированной водой.
13. Обезвоживают в 2 сменах 0,65% хлорида магния в ацетоне – по 5 минут.
14. Просветляют в ксилоле, заключают в балъзам.

Результат

Фосфолипиды – черно-синие.

11.4.4 Выявление холестерина методом Шульцца

В основе этого метода лежит окисление холестерина до оксихолестерина аммонийными квасцами. Метод может считаться специфичным, но для получения достоверных результатов предпочтительно использование срезов, полученных на замораживающем микротоме после фиксации материала в кальций-формоле.

Методика окраски

1. Собранные в воде срезы промывают дистиллированной водой.

2. Срезы помещают при 37°C в забуференный раствор железоаммонийных квасцов – 7 суток. Для его приготовления 2,5 г железоаммонийных квасцов растворяют в 100 мл 0,2М ацетаного буфера, рН 3,0. После окончания растворения рН раствора около 2,0.

3. Срезы промывают в 0,2 М ацетатном буфере – трехкратно по 1 часу.

4. Промывают дистиллированной водой.

5. Выдерживают в 5% растворе формалина – 10 минут.

6. Монтируют срезы на предметные стекла.

7. На покровное стекло наносят каплю смеси ледяной уксусной и серной кислот, приготовленной в соотношении 1:1, на ледяной бане. Затем переворачивают предметное стекло со срезом и осторожно кладут его на покровное, слегка прижимая.

8. Незамедлительно микрофотографируют.

Результат

Холестерин и его эфиры приобретают сине-зеленое окрашивание, через 30-60 минут окраска меняется на синюю.

11.5. Гистохимия пигментов

Пигменты – это группа веществ, поглощающих свет в видимом спектре и наблюдаемых в неокрашенных клетках и тканях. По происхождению пигменты делятся на экзогенные (угольная пыль, отложения металлов, химиотерапевтических препаратов) и эндогенные (меланин, липофусцин, каротиноиды).

11.5.1. Выявление билирубина, гемосидерина и липофусцина по Гленнеру

Для фиксации материала нежелательно применение кислых фиксаторов. Предпочтительно использование замороженных срезов.

Методика окраски

1. Приготовленные в криостате, монтированные на стекла и подсушенные срезы инкубируют в 2% растворе гексацианоферрата калия – 5 минут.

2. Обрабатывают свежеприготовленной смесью равных частей 2% гексацианоферрата калия и 5% уксусной кислоты – 20 минут.

3. Ополаскивают в проточной воде и обрабатывают 3% раствором бихромата калия рН 2,2 – 15 минут.

4. Промывают водой.

5. Окрашивают свежeproфильтрованным раствором красного О в изопропанолe – 20 минут.

6. Промывают в проточной воде – 5 минут.

7. Заключают в сироп Апати. Для его приготовления 10 г гуммиарабика и 10 г сахара растворяют на водяной бане в 10 мл дистиллированной воды. Для длительного сохранения добавляют кристаллики тимола.

Результат

Липофуscyны окрашиваются в оранжево-красный цвет; гемосидерин – в синий; билирубин – в темный изумрудно-зеленый.

11.5.2. Метод Перлса для выявления трехвалентного железа

При использовании этого метода желательна формалиновая фиксация и заливка в парафин

Методика окраски

1. Довести срезы до воды.

2. Инкубировать срезы в свежеприготовленном растворе, содержащем в равных пропорциях 2% ферроцианид калия или натрия и 2% соляную кислоту, в течение 30-60 минут.

3. Промыть в дистиллированной воде.

4. Подкрасить ядра 1% водным раствором нейтрального красного в течение 3-5 минут.

5. Промыть, обезводить, просветлить и заключить срезы.

Результат

Участки локализации трехвалентного железа окрашиваются берлинской лазурью, ядра окрашиваются в красный цвет.

11.5.3. Выявление меланина по Лилли

Выявление меланина основано на его способности образовывать комплексы с ионами двухвалентного железа, которые выявляются гексацианоферратом калия в реакции турбулентной сини.

Методика окраски

1. Депарафинированные срезы доводят до воды.
2. Инкубируют в 2,5% растворе сульфата железа гептагидрата – 60 минут.
3. Промывают в 4 сменах дистиллированной воды – по 5 минут.
4. Помещают в 1% раствор гексацианоферрата калия в 1% уксусной кислоте – на 30 минут.
5. Промывают 1% уксусной кислотой.
6. Докрашивают пикрофуксином по Ван-Гизону (см. выше).
7. Обезвоживают, просветляют, заключают в бальзам.

Результат

Меланин и гемосидерин – темно-зеленые на бесцветном фоне.



ГЛАВА 12

ОСНОВЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

12.1. Принципы иммуногистохимического анализа

Иммуногистохимия – метод окраски биологического материала в условиях сохранения морфологии клеток, позволяющий определить локализацию искомого антигена в различных тканях, типах клеток, клеточных структурах с помощью специфических антител и чувствительных систем детекции.

Антиген – это вещество, несущее признаки генетически чужеродной информации. Антиген можно определить как молекулу, распознаваемую иммунокомпетентными клетками как чужеродную (не свою). Свойствами антигена обладают бактерии, вирусы, паразиты, чужеродные клетки и ткани, мутационно изменившиеся собственные клетки, продукты жизнедеятельности чужеродных клеток.

Антитела – иммуноглобулины, молекулы сложных белков, способные специфически соединяться с соответствующими антигенами. Антитела синтезируются В-лимфоцитами и плазмócитами. При иммуноцитохимическом исследовании используются меченые антитела, ими выявляют антигены тканей.

В роли антигенов могут выступать как разнообразные химические соединения, находящиеся в тканях, так и отдельные клеточные структуры (ядро, цитоплазматические органеллы).

В настоящее время чаще используют моноклональные меченые антитела. Они идентичны по специфичности, сродству к антигенам, имеют стабильную молекулярную организацию. Прodуцируются моноклональные антитела гибридомами, образованными слиянием В-лимфоцитов селезенки иммунизированной

ного животного и клеток культуры миеломы того же животного. Гибридомы обладают свойством быстро и неограниченно пролиферировать подобно опухоли. Одновременно, они синтезируют антитела, как В-лимфоциты и плазматические клетки. Поскольку производство моноклональных антител и контроль за их качеством очень трудоемки, в большинстве лабораторий пользуются готовыми антителами, производимыми специализированными зарубежными и отечественными фирмами.

В зависимости от того, чем метятся антитела, выделяют иммунофлуоресцентные, иммуноферментные, иммуноизотопные и другие методы исследования. Использование меченых различными метками антител в одном и том же образце ткани позволяет одновременно выявить несколько разновидностей антигенов.

Другая классификация методов иммуномечения основана на принципе прямого связывания меченого антитела с антигеном или через немеченые антитела.

Прямой метод основан на выявлении тканевого антигена с помощью меченых антител (рис.17). Недостатками прямого метода является его низкая чувствительность и значительное фоновое окрашивание, вызванное неспецифическим связыванием. Достоинствами метода являются его простота и быстрота, поэтому его часто используют при экспресс-диагностике.



Рис.17. Прямой метод иммуномечения.

1 – исследуемый образец, 2 – выявляемый антиген, 3 – антитело с меткой.

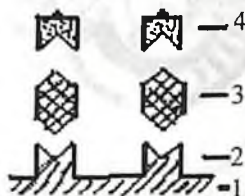


Рис.18. Непрямой метод иммуномечения.

1 – исследуемый образец, 2 – выявляемый антиген, 3 – антитело, 4 – антитело с меткой.

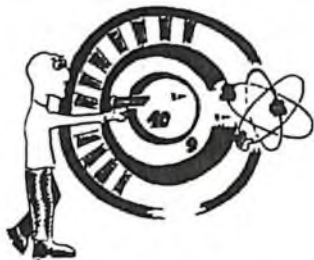
Непрямой метод основан на том, что немеченые антитела выявляют с помощью вторых меченых антител к первым антителам. То есть антитела, связывающиеся с тканевыми антигенами, сами являются антигенами по отношению ко вторым антителам (рис.18).

Этот метод более трудоемок, требует затрат времени и реактивов. При использовании этого метода необходима постановка контролей, исключающих фоновое окрашивание. Вместе с тем этот метод более специфичен и чувствителен, одни и те же меченые антитела могут быть использованы для выявления мест связывания различных видов первых антител и антигенов.

Существуют различные вариации прямого и непрямого методов. На их основе разработаны методики немеченых антигенов, пероксидаза – антипероксидазные, авидин - биотиновые методики.

Для выявления мест связывания антигена с антителом используются светооптические и электронномикроскопические методы исследования.

12.2. Подготовка материала к иммунному окрашиванию



Подготовка материала к изготовлению срезов и их окраска при иммуноцитохимических исследованиях имеет некоторые особенности. Основное требование – этапы, предшествующие окрашиванию, должны максимально сохранять тканевые структуры, иммобилизовать антиген, максимально сохранив его антигенную активность.

В большинстве случаев иммуногистохимические реакции проводят на срезах предварительно фиксированных тканей, реже – на замороженных срезах нефиксированного материала. Выбор метода фиксации обусловлен тем, что непродолжительная фиксация и низкая концентрация фиксирующих жидкостей не обеспечивает достаточную сохранность тканевых структур. В то же

время, использование более концентрированных фиксаторов и удлинение времени фиксации может привести к снижению антигенной активности исследуемых структур. В каждом случае исследователь подбирает схему фиксации материала эмпирически.

Чаще всего, в иммуноцитохимических исследованиях используют параформальдегидные фиксаторы.

12.2.1. Параформальдегид 4%

Приготовление фиксирующего раствора

1. 4 г параформальдегида растворяют в 50 мл дистиллированной воды. При постоянном помешивании, нагревают на водяной бане до 60 -70°C.
2. Добавляют несколько капель 1N гидроксида натрия до просветления раствора.
3. Раствор фильтруют и охлаждают.
4. Добавляют 50 мл 0,2 М фосфатного буфера (pH 7,2 -7,4).

12.2.2. Фиксирующая жидкость Буэна

Приготовление фиксирующего раствора

1. Готовят насыщенный раствор пикриновой кислоты.
2. Фильтруют полученный раствор.
3. Добавляют формалин и ледяную уксусную кислоту в расчете: 3 части раствора пикриновой кислоты, 1 часть формалина и 0,2 части ледяной уксусной кислоты.

12.2.3. Фиксатор Замбони

(для электронномикроскопических исследований)

Приготовление фиксирующего раствора

1. В 99,6 мл 0,2М фосфатного буфера (pH 7,2-7,4) при постоянном помешивании и нагревании до 60-70°C, растворяют 4 г параформальдегида.
2. Добавляют каплями гидроксид натрия до просветления раствора.

3. После охлаждения добавляют 0,4 мл 25 % глутарового альдегида (особенно важно использование глутарового альдегида при исследовании легкодиффундируемых антигенов).

4. Добавляют 50 мг пикриновой кислоты. После ее растворения раствор фильтруют и доводят, при необходимости, рН до 7,2 – 7,4 1N соляной кислотой.

Фиксации погружным способом, в случае экспериментальных исследований, предшествует этап перфузии (см. главу 3). После этого иссекают интересующие образцы и дофиксируют в растворе фиксатора в течение 2-48 часов при температуре 4°C. Далее, материал тщательно отмывают от фиксатора так же 2-48 часов.

Для проведения иммуногистохимических реакций используют парафиновые, замороженные или вибраторные срезы.

При использовании парафиновых срезов, после фиксации материала, следуют этапы дегидратации и заливки. Для этого исследуемые образцы тканей последовательно инкубируют в 70% спирте – 2 часа, 96% спирте – 2 часа, в двух сменах 100% спирта – по 2 часа, в хлороформе – 12-16 часов, в трех сменах парафина – по 3 часа. Четвертый парафин разливают в формочки, помещают в них образцы и охлаждают. Учитывая, что такая обработка снижает антигенную активность, предпочтительно использовать, по возможности, менее тугоплавкие сорта парафина. Большие требования предъявляются к качеству приготовленных срезов. Незначительные повреждения или царапины на срезах, наносимые дефектами микротомных ножей, могут впоследствии стать участками появления неспецифического окрашивания. Обычно готовят срезы толщиной 3-8 мкм, монтируют их на стекла, высушивают, депарафинируют и регидратируют. В таком виде парафиновые срезы готовы к проведению иммуногистохимических реакций.

Криостатные срезы, предназначенные для иммуногистохимических реакций, готовятся так же, как и для других морфологических исследований.

Оптимальным, для иммуногистохимических реакций, является использование вибраторных срезов. Основным преимуществом является то, что их готовят сразу же после фиксации материала. Это позволяет избежать воздействия органических растворителей, высоких температур в процессе заливки материала, которые негативно отражаются на антигенных свойствах тканей. Однако фиксация в таких случаях должна быть «жесткой», чтобы обеспечить достаточную для резки плотность кусочков. Обычно, даже сильная фиксация не дает возможности готовить срезы толщиной менее 45-50 мкм. Кроме того, увеличение площади срезов сопровождается, как правило, ухудшением их качества, что в дальнейшем может приводить к появлению неспецифического окрашивания. Одним из преимуществ использования вибраторных срезов является и то, что их инкубируют свободноплавающими, что дает возможность лучшего проникновения реагентов к тканевым антигенам.

При инкубировании срезов, монтированных на покровных или предметных стеклах, используются специальные стекла, например, полилизиновые стекла (БиоВитрум) обработаны поли-L-лизином или Histo Bond (БиоВитрум) обработанные силаном и предназначенные для иммуногистохимических исследований. Можно использовать для этих целей обработку стекол готовыми адгезивными растворами.

12.2.4. Использование адгезивного раствора для предметных стекол

Novobond Slide Tissue Adhesive (Novocastra Laboratories)

Novobond Slide Tissue Adhesive существенно улучшает адгезию замороженных, парафиновых срезов, клеточных препаратов на предметных и покровных стеклах. Срезы тканей, помещенные на стекла, обработанные Novobond реагентом, остаются прикрепленными к стеклу и в процессе высокотемпературной обработки при антиген-демаскирующей методике. Такие стекла могут долго храниться, сохраняя свои адгезивные свойства. Реагент представляет собой концентрат, который разводится в 350

мл раствора для обработки (ацетон), что является достаточным для 500 предметных стекол стандартного размера.

Подготовка стекол

1. Чистые стекла помещают на металлические подставки для стекол. Рекомендуется использовать предварительно очищенные стекла хорошего качества или вымачивать стекла в растворе с детергентом и ополаскивать в проточной воде.

2. Погрузить стекла на 5 минут в ацетон.

Обработка стекол

3. Рабочий раствор Novobond Tissue Adhesive готовится разведением исходных 7 мл в 350 мл ацетона. Рабочий раствор готовится непосредственно перед использованием. 357 мл раствора достаточно для обработки 500 стекол.

4. Стеклами из ацетона необходимо несколько раз постучать о край подставки, чтобы убрать лишнюю жидкость, и сразу поместить в рабочий раствор на 5 минут.

5. Вынуть стекла. Убрать излишек реагента, осторожно погружая несколько раз на 30 секунд в деионизированную или дистиллированную воду (не создавая воздушных пузырей), меняя воду после каждой пятой подставки. Вынуть подставку для стекол на воздух для высыхания. Осторожно потрясти или постучать штативом со стеклами, чтобы удалить водяные капли, и как их результат, пятна на стекле.

6. Высушить стекла при комнатной температуре или при +37°C. Стекла могут быть использованы немедленно или храниться в коробке при комнатной температуре.

Прикрепление срезов

Для тканей, залитых в парафин – помещают плавающие в воде +45°C срезы на предметные стекла, высушивают срезы при +37°C в течение ночи. Срезы хорошо прикрепляются к предметным стеклам в результате нагревания в течение 1 часа при +56°C. Температура свыше +60°C не рекомендуется, так как мо-

жет произойти денатурация белков. Процесс депарафинизации проводится без особенностей.

Для замороженных срезов: дайте срезам подсохнуть на стеклах, обработанных адгезивным раствором. Все последующие процедуры проводятся как обычно.

После того, как срезы (парафиновые, криостатные или вибраторные) приготовлены, можно приступить к подготовке их к иммуномечению. Цель такой подготовки состоит в минимизации неспецифического окрашивания и создании оптимальных условий для эффективного взаимодействия антител с антигенами.

В процессе фиксации альдегидными фиксаторами формируются дополнительные внутримолекулярные связи, препятствующие взаимодействию антител с тканевыми антигенами. Разрушение таких связей возможно при обработке срезов в растворах протеолитических ферментов, таких как пепсин, трипсин, протеинкиназа. Однако при этом может повреждаться и сам исследуемый антиген, и молекулы предшественники с образованием антигенподобных структур, что может привести к появлению неспецифического окрашивания.

12.2.5. Демаскировка антигена при помощи трипсина (рекомендации фирмы Novocastra Laboratories)

Необходимые реактивы

1. 50 mM раствор трис-буфера.
2. Трипсин 250: (Vecton Dickinson Difco 0152-13). Можно использовать также трипсин, содержащий химотрипсин. Ферментная активность может варьировать в зависимости от поставщика и лота. Данные факторы влияют на время инкубации.
3. Хлорид кальция.
4. 1M гидроксид натрия.

Методика демаскировки

1. На водяной бане нагреть до +37°C 200 мл раствора трис-буфера и 200 мл дистиллированной воды.

2. Растворить 0,2 г трипсина 250 и 0,2 г хлорида кальция в 200 мл трис-буфера.
3. Довести раствор трипсина до pH 7,8 при +37°C 1М гидроксидом натрия.
4. Поместить дегидратированные парафиновые препараты в дистиллированную воду при +37°C на 5 минут для прогрева.
5. Инкубировать препараты с трипсином при +37°C в течение 30 минут. Время инкубации может меняться в зависимости от исследуемого материала.
6. Промыть препараты в проточной воде.
7. Приступить к дальнейшей постановке иммуногистохимического окрашивания.

12.2.6. Раствор для восстановления структуры антигена Retrivagen A (Novocastra Laboratories)

Retrivagen A (pH 6,0) – раствор для восстановления структуры антигенов. Рекомендуются для тканей, фиксированных формалином или цинковым фиксатором и залитых в парафин. Предполагаемый механизм действия раствора Retrivagen A состоит в разрыве перекрестных сшивок между белковыми молекулами.

Приготовление рабочего раствора

Retrivagen A поставляется в виде 2 отдельных растворов. Для приготовления рабочего раствора взять 18 мл раствора №1 и 82 мл раствора №2. Довести смесь до 1 л дистиллированной водой. Рабочий раствор хранится в холодильнике при +4°C не более 1 месяца.

Методика демаскировки

1. Депарафинизировать срезы в двух сменах ксилола по 10 минут в каждой.
2. Промыть стекла дважды в 100% этиловом спирте по 2 минуты.

3. Блокировать эндогенную пероксидазу путем инкубирования в течение 10 минут в 3% перекиси водорода. Промыть 2-3 раза в воде.

4. Поместить срезы в пластиковые контейнеры или чашки для окрашивания с рабочим раствором Retrivagen A и нагреть до +98°C в микроволновой печи.

5. Перемешать раствор и продолжать инкубацию при +98°C еще 10 минут.

6. Извлечь контейнеры из печи, накрыть и оставить стекла в растворе для медленного остывания до комнатной температуры приблизительно на 20 минут.

7. Промыть стекла 2-3 раза, каждый раз меняя воду. Далее можно переходить к процедуре блокирования с помощью нормальной сыворотки и окраске первичными антителами.

Несмотря на процедуру восстановления структуры антигена, некоторые антитела не окрашивают фиксированные формалином ткани. В этой ситуации рекомендуются фиксация в более мягком фиксаторе, например, цинковом (BD PharMingen Cat.No. 550523, Novocastra Laboratories). Однако, некоторые антигены не сохраняются даже при самой мягкой фиксации. В данном случае для иммуногистохимического окрашивания используются свежемороженые ткани.

При исследовании антигенов с внутриклеточной локализацией рационально проводить прединкубацию срезов в растворах детергентов (сапонин, тритон X-100). Такие вещества, повреждая липидный бислой, увеличивают проницаемость клеточных мембран и облегчают, таким образом, доступ антител к антигенам. Тритон X-100 используют в виде 0,3% раствора на 2M фосфатном буфере (pH 7,2 - 7,4), приготовленного на изотоническом растворе хлорида натрия (ПБС).

Проблема неспецифического окрашивания возникает и тогда, когда в качестве маркеров антител используются ферменты, возможно содержащиеся и в исследуемых образцах. Часто в качестве маркера антител используют пероксидазу, которая содержится, например, в клетках крови. Щелочная фосфатаза, ко-

торая также используется в качестве метки, содержится в костной ткани, тканевых структурах слизистой оболочки пищеварительной системы. Эндогенный биотин, содержание которого велико в печени, может создать неспецифическое окрашивание при использовании авидин-биотинового метода.

Для устранения данного вида неспецифического окрашивания необходимо подавлять активность эндогенных ферментов. Так, для подавления активности эндогенной пероксидазы можно прединкубировать срезы в 0,2–1,0% растворе перекиси водорода на ПБС при комнатной температуре. Продолжительность инкубации подбирается эмпирически. Активность щелочной фосфатазы ингибируется левамизолом. Эндогенный биотин можно инактивировать свободным авидином с последующим насыщением его связей немеченым биотином.

12.3. Проведение реакций иммуномечения и выявление маркера

Первичные антитела поступают в продажу в лиофилизированной, жидкой форме или готовыми к применению. Из лиофилизированных форм сначала готовят концентрированные растворы. Для приготовления стандартного концентрированного раствора лиофилизированный супернатант тканевой культуры разводят 1 мл стерильной дистиллированной воды. Хранят лиофилизированные антитела (при сохранной фирменной герметичной упаковке) при +4°C (согласно указанного срока годности). Разведенные антитела можно хранить до 2 месяцев при +4°C. Для более длительного хранения рекомендуется разлить раствор антител на аликвоты и поместить в холодильник при –20°C. Рабочие растворы готовятся только в объемах, расходуемых в день приготовления. Размороженные аликвоты повторно замораживать не рекомендуется. Антитела, поступающие в продажу в жидких формах, хранятся при +4°C.

Важнейшим условием правильного проведения иммуногистохимических реакций является подбор разведения первых

(специфических) антител. Разводить концентрированные антитела следует специальными фирменными растворами для разведения или 1,5% раствором блокирующей сыворотки в ПБС или трис-буферах (приложение 4).

Разведение подбирается эмпирически, по результатам инкубации срезов с удваивающимся разведением сыворотки. При использовании концентрированных сывороток с разведением 1:50 – 1:400, инкубация может быть непродолжительной (30 – 40 минут) и проводиться при комнатной температуре. При использовании сывороток с большим разведением (1:20000), продолжительность инкубации может быть увеличена до 2 суток и проводиться при температуре 4°C. При оптимальном разведении наблюдается максимальное специфическое и минимальное неспецифическое (фоновое) окрашивание. После инкубации срезы тщательно промываются большим количеством ПБС.

Использование непрямого метода требует подбора не только первой, но и второй антисыворотки. Т. Jones и J. Gregory (1988) предложили для этого оригинальную схему. По горизонтали в таблицу заносят последовательно разведения первых антител, по вертикали – вторых. Сочетание разведений, при котором выявляется оптимальный результат и используется в дальнейшем.

При использовании непрямого метода, подготовка срезов к иммуномечению проводится так же, как и при прямом методе. Отличие методики иммуномечения состоит в том, что после инкубации с первыми, немечеными антителами и последующего отмывания в трех сменах ПБС, срезы инкубируют со вторыми, мечеными антителами, в оптимальном разведении, в течение 30–60 минут при комнатной температуре, с последующим отмыванием срезов в трех сменах ПБС по 30 минут в каждой.

Следующий этап иммуномечения – выявление маркера. Поскольку пероксидаза оказалась универсальным маркером антител, были разработаны различные методики ее выявления. Основная группа таких методик основана на взаимодействии пероксидазы с субстратом ферментативной реакции – перекисью водорода с хромогеном. В процессе реакции образуется ком-

плекс пероксидазы с перекисью водорода, взаимодействующий с донором электронов, в результате чего образуется нерастворимый окрашенный продукт реакции и вода. В качестве донора электронов чаще всего используют 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорид (ДАБ), образующий в месте реакции темно-коричневый нерастворимый осадок. Кроме того, для выявления пероксидазы можно использовать 3-амино-9-этикарбазол, дающий красное окрашивание; п-парафенилендиаминдигидрохлорид – зеленое; 4-хлоро-1-нафтол – синее.

12.3.1. Выявление пероксидазы с помощью 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида (ДАБ)

Приготовление рабочего раствора

1. 10 – 60 мг ДАБ растворяют в 100 мл 0,05М трис-НСl-буфера или ПБС.
2. Раствор фильтруют, при необходимости хранят длительное время в темноте при - 20°C.
3. Перед применением к 10 мл ДАБ - раствора добавляют 100 мкл 3% перекиси водорода (такой раствор сохраняет активность не более 45 мин).

Методика окрашивания

Срезы инкубируют в рабочем растворе 10–20 минут под контролем микроскопа при минимальном освещении, так как реактивы фотонестабильны.

Результат

Участки, содержащие пероксидазу окрашиваются в темно-коричневый цвет.

12.3.2. Выявление пероксидазы 3-амино-9-этилкарбазолом

Матричный раствор

0,4% 3-амино-9-этилкарбазол в диметилформамиде.

Рабочий раствор

К 0,5 мл матричного раствора добавляют 9,5 мл ацетатного буфера (pH 5,0) и 0,15 мл 3% перекиси водорода.

После проведения реакций иммуномечения и выявления маркера срезы подкрашивают и заключают. Выбор метода окраски зависит не только от задач исследования, но и от того, насколько растворим продукт иммуногистохимической реакции или метка. Этапы дегидратации, просветления и заключения в прозрачные среды (канадский бальзам, полистирол) проводятся, если продукты иммуногистохимической реакции и первичные метки не растворимы в воде и спиртах. Если продукты реакции и метка растворимы в воде и спиртах, то срезы можно заключать только в водорастворимые среды (смеси, содержащие глицерин). В этом случае анализ полученных результатов и фотодокументирование следует проводить в сжатые сроки, так как такие препараты быстро выцветают и становятся непригодными для просмотра.

При использовании готовых наборов для иммуногистохимического окрашивания, используют прописи, предлагаемые фирмой-изготовителем. В качестве примера приведем пропись авидин-биотинового и стрептавидин-биотинового методов, предлагаемых фирмой Novocastra Laboratories.

12.4. Авидин-биотиновая система детекции для иммуногистохимического метода исследования (рекомендации фирмы Novocastra Laboratories)

Авидин – это гликопротеин с молекулярной массой 68 кД, имеющий очень высокое сродство к биотину – витамину с малой молекулярной массой. Так как это сродство более чем в миллион раз сильнее, чем связь антитела с антигеном, связывание авидина с биотином (в отличие от взаимодействия антигена с антителом) практически необратимо. В дополнение к высокой аффинности, авидин-биотиновая система отличается высокой чувствительностью, поскольку авидин имеет четыре участка для

связи с биотином, и большинство белков (исключая антитела и ферменты) могут связываться с несколькими молекулами биотина. Эти аспекты обеспечивают возможность образования макромолекулярных комплексов между авидином и биотинилированными ферментами.

Иммунопероксидазный метод, основанный на взаимодействии авидина и биотина, был создан для определения локализации разнообразных гистологически значимых антигенов и других маркеров. На первом этапе на препарат наносят немеченные первичные антитела, далее следуют биотинилированные вторичные антитела и затем инкубируют с Авидин Биотиновым макро-молекулярным комплексом с пероксидазой хрена. Эта методика называется АВС метод.

Novostain Super АВС наборы содержат реагенты: Авидин ДН и биотинилированная пероксидаза хрена Н, которые специально подготовлены для формирования пероксидазного комплекса при иммунопероксидажном окрашивании. Хотя структура комплекса Авидин ДН/ биотинилированная пероксидаза хрена еще не совсем известна, предполагается, что она состоит из множества молекул биотинилированной пероксидазы хрена, перекрестно-соединенных авидином и располагается в трех плоскостях. Комплекс, очевидно, имеет мало свободных биотиновых остатков, но всегда сохраняет, по крайней мере, один биотиновый участок для связывания. Формирование комплекса достигается смешиванием Авидина ДН и биотинилированной пероксидазы хрена Н в растворе в определенных количествах перед использованием. После первоначальной инкубации происходят небольшие изменения в комплексе, рассматриваемые как резервное повышение чувствительности иммунопероксидажной окраски. Комплекс остается стабильным несколько часов после формирования, и в некоторых случаях может быть использован в течение нескольких дней после приготовления.

Лицензировано патентом США № 4, 684, 609.

Состав набора

1. Блокирующая нормальная сыворотка – 5 мл.
 2. Биотинилированные афинно-очищенные антитела к иммуноглобулинам – 1 мл.
 3. Реагент А (Авидин ДН) – 2 мл.
 4. Реагент В (Биотинилированный фермент) – 2 мл.
 5. Три флакона для смешивания.
- Набор не содержит буферы и хромогенный субстрат.

Приготовление рабочих растворов

Novostain Super ABC набор включает флаконы для приготовления рабочих растворов реагентов. Содержащийся в наборе наконечник для распыливания находится в инвертированном состоянии и не вставлен во флакон. После того, как буфер и соответствующие реагенты были добавлены во флакон, вставьте наконечник в белую непрозрачную крышку в правильном направлении. Наденьте крышку с наконечником на флакон. Как только крышка плотно закроет флакон, наконечник займет правильное положение. При удалении наконечника для промывки нажмите сбоку большим пальцем до щелчка. При перестановке наконечника на соответствующий флакон для предотвращения контаминации реагентов соблюдайте осторожность. Все флаконы для приготовления реактивов промаркированы. Для предотвращения высыхания плотно закрывайте крышки флаконов соответствующим образом, если реагент не используется. При распределении капель переверните флакон вертикально и мягко надавите на стенки. Нанесите достаточное количество капель на предметное стекло, чтобы полностью покрыть препарат. Во время инкубации предметные стекла должны быть помещены во влажную камеру. При постановке реакции можно использовать посуду для окраски и коплиновские емкости. Для приготовления рабочих растворов используйте рекомендации в инструкции и соблюдайте пропорции «капли/объем».

В наборе Novostain Super ABC можно использовать ряд различных буферов. Одним из наиболее распространенных является 10mM натриево-фосфатный буфер, pH 7,5, 0,9% раствор (PBS). Для Novostain Super ABC системы рабочие растворы готовят следующим образом.

Блокирующая сыворотка (нормальная сыворотка): в промаркированный флакон добавьте две (2) капли (100 мкл) сыворотки к 5 мл буфера. Для блокирования предпочтительна сыворотка вида животного, от которого были получены биотинилированные вторичные антитела.

Биотинилированные антитела: в промаркированный флакон добавьте две (2) капли (100 мкл) нормальной блокирующей сыворотки к 5 мл буфера и далее добавьте две (2) капли (100 мкл) раствора биотинилированных антител.

Novostain Super ABC Реагент: в большой флакон для смешивания добавьте две (2) капли Реагента А к 5 мл буфера ABC Реагента. Далее добавьте две (2) капли реагента В в тот же флакон, немедленно перемешайте и оставьте Novostain Super ABC Реагент на 30 мин до использования.

Приготовление субстрата

Смешайте в равных объемах 0,02% раствор перекиси водорода (приготовленного из концентрированного 30% раствора и дистиллированной воды) и 0,1% (1 мг/мл) раствор диаминобензида тетрахлорида (ДАВ), приготовленного в 0,1 М Трис буфере, рН 7,2. Раствор перекиси водорода должен быть свежеприготовленным из концентрированного. Многие пероксидазные субстраты нестабильны под воздействием света. Для получения наилучших результатов раствор субстрата и пероксидазы должен быть приготовлен непосредственно перед использованием.

ДАВ является потенциальным канцерогеном. При работе с ним необходимо соблюдать осторожность и уничтожать полностью субстрат после использования.

Окрашивание парафиновых срезов

1. Провести депарафинизацию и дегидратацию тканевых срезов ксилолом или другими реагентами и проводку через спирты.
2. Промыть 5 мин в дистиллированной воде.

3. Если необходимо блокировать эндогенную пероксидазу, инкубируйте срезы в течение 30 мин в растворе 0,3% перекиси водорода в метаноле. Время инкубации можно сократить, увеличив концентрацию перекиси водорода. При отсутствии эндогенной пероксидазы в препарате, пункт 3 можно пропустить.

4. Промыть в буфере 10 мин.

5. Инкубировать срезы 20 минут в блокирующей сыворотке.

6. Промокнуть излишнюю сыворотку по краю среза.

7. Инкубировать срезы 30 мин с первичными антителами, разведенными в буфере.

8. Промыть 10 минут в буфере.

9. Инкубировать срезы 30 минут с разведенными биотинилированными вторичными антителами.

10. Промыть 10 минут в буфере.

11. Инкубировать срезы 30 мин в растворе Novostain Super ABC Реагента.

12. Промыть 10 минут в буфере

13. Инкубировать срезы в растворе хромогена 2-7 мин или до появления интенсивной окраски.

14. Промыть предметные стекла 5 мин в проточной воде.

15. Докрасить, очистить и покрыть заключающим раствором.

Окрашивание замороженных срезов

Методика предназначена для замороженных срезов, цитологических мазков-отпечатков или центрифугированных препаратов.

1. Препараты высушите на воздухе.

2. Непосредственно перед окрашиванием фиксируйте в ацетоне или в указанном для антигена фиксаторе.

3. Промыть в буфере 10 мин.

4. Если необходимо блокировать эндогенную пероксидазу, последуйте п.3 протокола для парафиновых срезов. В некоторых случаях, особенно при использовании моноклональных антител, антиген может быть разрушен обработкой перекисью водорода.

В таких случаях данная процедура может быть использована только после инкубации с биотинилированными антителами.

5. Следующие шаги 4-15 по окрашиванию препаратов проводятся так же, как и для парафиновых срезов.

После завершения процедуры окрашивания разведенные рабочие растворы должны быть вылиты, а контейнеры промыты дистиллированной водой. Хранить контейнеры следует вместе с основными реагентами в упаковке набора.

Процедура быстрого окрашивания

Чувствительность Novostain Super ABC набора допускает укороченный протокол иммунопероксидазного окрашивания.

1. Подготовьте залитые в парафин или замороженные срезы для окрашивания, как было описано в предыдущих разделах.

Приготовьте Novostain Super ABC реагенты следующим образом: Биотинилированные антитела – добавьте одну каплю концентрированного антитела к 5 мл PBS, содержащего 1,5% нормальной сыворотки. Если существует проблема фонового окрашивания, повышайте концентрацию нормальной сыворотки до 10%. Для Novostain Super ABC Реагента добавьте две капли реагента А к 2,5 мл буфера, перемешайте, затем добавьте две капли реагента В. Перемешайте и оставьте на 5 - 30 мин до использования.

2. Если необходимо блокировать эндогенную пероксидазу, инкубируйте срезы в течение 3-5 мин в растворе 3% перекиси водорода и дистиллированной воды.

3. Промойте осторожно под струей буфера.

4. Если существует проблема фонового окрашивания, инкубируйте срезы в 2% - 10% нормальной сыворотке в буфере 5-10 мин.

5. Инкубируйте срезы с первичными антителами (выбор концентрации, время окраски и температура должны следовать индивидуальным требованиям исследователя). Повышение чувствительности Novostain Super ABC набора позволяет сокращать время инкубации с первичными антителами.

6. Промойте аналогично шагу 3.

7. Инкубируйте срезы 10 мин с разведенными биотинилированными вторичными антителами.
8. Промойте аналогично шагу 3.
9. Инкубируйте срезы 5 мин с Novostain Super ABC Реагентом.
10. Промойте аналогично шагу 3.
11. Инкубируйте срезы с хромогеном 2-5 мин или до появления интенсивной окраски.
12. Промойте аналогично шагу 3.
13. Докрасить, очистить и покрыть заключающим раствором.

Замечания

1. Растворы, содержащие азид натрия или другой ингибитор пероксидазной активности, не следует использовать для приготовления пероксидазного субстрата из набора Novostain Super ABC. Не следует добавлять неиммунную сыворотку, сухое нежирное молоко, культуральную среду или другой потенциальный источник биотина к ABC реагенту. В результате может снизиться чувствительность анализа.

2. Другие пероксидазные субстраты, такие как 3-амино-9-этилкарбазоль (АЕС), Реагент Хансег-Yates, о-диазидин, могут заменить DAB. При использовании альтернативного хромогена оптимальные условия окрашивания (время, концентрация и pH) должны быть установлены исследователем. Некоторые гистологические красители могут быть несовместимы с пероксидазными субстратами и другие субстраты, в отличие от DAB, могут требовать водоосновное покрытие.

3. В присутствии ионов никеля инкубация с DAB приводит к серо-коричневому окрашиванию. Это может увеличить чувствительность анализа и из-за различий в цвете позволяет проводить методику двойного окрашивания.

4. Если реагенты должны быть разведены выше рекомендуемой концентрации, в первую очередь подготовьте разведенные биотинилированные антитела и Novostain Super ABC Реагент как описано в инструкции. Последующие разведения долж-

ны быть приготовлены в буфере, содержащем 0,1% кристаллического бычьего сывороточного альбумина (BSA). Может быть использована только кристаллическая форма BSA, так как другие препараты могут содержать нежелательное загрязнение. Разведение этих реагентов может требовать более длительного времени инкубации и /или высокой температуры инкубации для достижения максимальной чувствительности.

5. Парафиновые срезы должны быть хорошо приготовлены. Фиксация (обычно в забуференном формалине, концентрация формальдегида не должна превышать 4%) должна обеспечивать целостность срезов на всем протяжении процедуры окрашивания, но в тоже время не быть жесткой, разрушающей антигены. Если окрашивание отсутствует, то может потребоваться демаскировка антигенов до обработки первичными антителами. На всем протяжении окрашивания не позволяйте срезам высыхать. Используйте влажную камеру для инкубации.

6. Избегайте абсорбции первичных антител в пластиковых и стеклянных контейнерах, в которых производится последнее разведение. Первичные антитела могут быть разведены в буфере, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина, или блокирующей сывороткой.

7. Используйте только свежеприготовленные буферы. При комнатной температуре может произойти бактериальное заражение, что отражается на степени окрашивания. Рекомендуется пероксидазный раствор готовить в дистиллированной воде. Деионизированная вода может содержать ингибиторы к пероксидазе и снижать чувствительность анализа.

8. Реагенты из Novostain Super ABC набора следует хранить при +2 – +8°C (в холодильнике). Для лучшего использования следует израсходовать весь набор до срока, указанного на коробке. Реагенты А и В в наборе парные. Нельзя использовать реагент А из одного набора и реагент В из другого. Рекомендуется хранить реагенты в той упаковке, в которой они были поставлены.

9. Для оптимального окрашивания срезы нервной ткани и срезы толще, чем обычные, следует дольше инкубировать.

10. Не используйте яичный белок для покрытия стекол. Следы авидина яичного белка влияют на качество окраски. Для предотвращения отставания срезов от стекол необходимо обработать стекла Novobond Slide Tissue Adhesive (NCL-BOND), белковым адгезивным раствором.

11. Важна полная депарафинизация. Просветляющие составы и спирты должны регулярно меняться. Все шаги депарафинизации должны быть строго соблюдены для полного удаления парафина со срезов.

12. Если требуются меньшие объемы рабочих растворов, рекомендуется каплю основного раствора поместить в небольшую пластиковую коническую пробирку. Далее можно будет взять необходимую часть реагента. Для предотвращения контаминации не меняйте крышки с капельницей на флаконах.

12.5. Стрептавидин-биотиновая система детекции для иммуногистохимического метода исследования (рекомендации фирмы Novocastra Laboratories)

В набор входят 3 реагента в готовом для использования виде:

1. Неиммунная сыворотка лошади.
2. Биотинилированные вторичные антитела (лошади) к IgG кролика, IgG мыши, IgM мыши.
3. Готовый к использованию стрептавидин/пероксидазный раствор.

Каждый реагент находится в специальном отдельном флаконе-капельнице. Необходимо покрывать весь срез рабочим раствором и не допускать высыхания. Все этапы инкубации проводят во влажной камере.

Для локализации фермента пероксидазы в тканевых срезах используют различные хромогены. Наиболее часто используют диаминобензидин тетрагидрохлорид (DAB) и 3-амино-9-этил карбазоль (AEC). Реакция с DAB приводит к красно-коричневому окрашиванию препаратов или серо-черному в при-

сутствии некоторых катионов тяжелых металлов. DAB не растворяется спиртом и другими растворителями и дает возможность заключать препараты для длительного хранения.

Окрашивание парафиновых срезов

1. Провести депарафинирование тканевых срезов. Проведите процедуру демаскировки антигена, если это требуется в инструкции, приложенной к первичным антителам.

2. Промыть под струей воды, а затем промыть в фосфатно-солевом буфере (при наличии эндогенной пероксидазы в ткани, инкубировать препараты 30 минут в 0,3% растворе перекиси водорода в метаноле или 5 минут в 3% растворе перекиси водорода в воде).

3. Инкубировать срезы 10 минут в блокирующей сыворотке при температуре 25°C.

4. Промокнуть излишнюю сыворотку со срезов. (Не смывать!)

5. При температуре 25°C инкубировать срезы с первичными антителами, разведенными в буфере с 1,5% содержанием блокирующей сыворотки (NCL-H-SERUM). Время инкубации зависит от концентрации первичных антител. Обычно концентрация первичных антител определяется по оптимальному окрашиванию при инкубации от 15 минут до 1 часа.

6. Промыть 5 минут в PBS.

7. Инкубировать срезы 10 минут с биотинилированными вторичными антителами при температуре 25°C.

8. Промыть 5 минут в PBS.

9. Инкубировать срезы 10 минут в стрептавидин/пероксидазном комплексе при температуре 25°C.

10. Промыть 5 минут в PBS. В большинстве случаев промывка между инкубациями с реагентами должна быть быстрой по времени.

11. Инкубировать срезы с хромогеном до появления интенсивной окраски (для уточнения времени инкубации с хромогенным субстратом – см. замечание 2).

12. Промыть под струей воды.

13. Докрасить, покрыть заключающим раствором.

Окрашивание криостатных срезов

Эта методика предназначена для криостатных срезов, цитологических или цитоцентрифужных препаратов.

1. Используют нефиксированные, фиксированные в ацетоне или в соответствующих для искомого антигена фиксаторах.

2. При блокировании эндогенной пероксидазы, чтобы снизить риск разрушения антигенов и сохранить морфологию ткани, используйте щадящие режимы обработки материала: 0,3% перекись водорода и 0,3% – NHS в PBS – 5 минут; или 0,3% перекись водорода в метаноле 30 минут. Если необходимо, инкубация с перекисью водорода может быть выполнена после инкубации с биотинилированными вторичными антителами.

3. Следующие шаги (2-13) по окрашиванию препаратов проводятся так же, как и для парафиновых срезов.

Замечания

1. Растворы, содержащие азид натрия или другой ингибитор пероксидазной активности, не следует использовать для приготовления пероксидазного субстрата. Не следует добавлять немимунную сыворотку, сухое нежирное молоко, культуральную среду или другой любой потенциальный источник биотина к стрептавидин/пероксидазному комплексу. В результате, может снизиться чувствительность анализа.

2. Время поэтапной инкубации может варьировать в зависимости от антигена требуемой интенсивности окрашивания или от используемого субстрата. Инкубация с DAB протекает от 2 до 10 минут.

3. В присутствии ионов никеля инкубация с DAB приводит к серо-коричневому окрашиванию. Это может увеличить чувствительность анализа и из-за различий в цвете позволяет проводить методику двойного окрашивания.

4. Парафиновые срезы должны быть хорошо приготовлены. Фиксация (обычно в забуференном формалине, концентрация формальдегида не должна превышать 4 %) должна обеспечивать

целостность срезов на всем протяжении процедуры окрашивания, но в тоже время, не быть жесткой, разрушающей антигены. Если окрашивание отсутствует, может потребоваться демаскировка антигенов до обработки первичными антителами. На всем протяжении окрашивания не позволяйте срезам высыхать. Все этапы инкубации проводят во влажной камере.

5. Избегайте абсорбции первичных антител в пластиковых и стеклянных контейнерах, в которых готовят последнее разведение. Первичные антитела можно разводить в буфере, содержащем 0,1% бычий сывороточный альбумин, или разведенной блокирующей сывороткой (NCL-H-SERUM).

6. Используйте только свежеприготовленные буферы. При комнатной температуре может произойти бактериальное заражение, что отражается на степени окрашивания. Рекомендуется готовить пероксидазный раствор в дистиллированной воде. Деионизированная вода может содержать ингибиторы пероксидазы и снижает чувствительность анализа.

7. Готовые к использованию реагенты следует хранить при +2 - +8°C. Рекомендуется израсходовать весь набор до срока, указанного на коробке. Храните реагенты в той упаковке, в которой они были поставлены.

8. Препараты нервной ткани и более толстые срезы следует дольше инкубировать для оптимального окрашивания.

9. Образцы, заключенные в парафин не следует нагревать выше 60°C. Слишком интенсивное нагревание может разрушить антигены. После заключения, парафиновые срезы оставляют в термостате при +37°C на ночь. Нагревая срезы 1 час при +50 - +56°C, следует удостовериться, что не произошло повреждение срезов. Некоторые стекла содержат «горячие пятна», что может привести к перегреву ткани. Важна полная депарафинизация. Просветляющие составы и спирты должны регулярно меняться. Все шаги депарафинизации должны быть строго соблюдены для полного удаления парафина со срезов.

10. Не используйте яичный белок для покрытия стекол. Следы авидина яичного белка влияют на качество окраски. Для предотвращения отставания срезов от стекол необходимо обра-

ботать стекла Novobond Slide Tissue Adhesive (NCL-BOND) или другим адгезивным раствором.

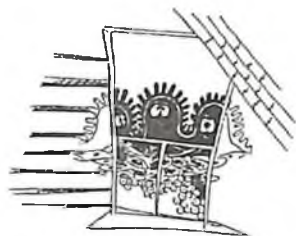
11. Смягчающие лосьоны для рук могут влиять на прикрепление срезов к стеклу или препятствовать проникновению реагентов в ткань. Избегайте контакта рабочих растворов с кожей рук.

12.6. Контроль специфичности иммуномечення

Как упоминалось выше, при проведении иммуногистохимических реакций приходится сталкиваться с проблемой неспецифического окрашивания. Некоторые приемы устранения фонового окрашивания излагались при описании методик подготовки срезов к иммуномечению. Насколько специфично окрашивание, полученное в результате иммуногистохимической реакции, позволяет оценить система контроля специфичности иммуноокрашивания. В нее включаются, по меньшей мере, позитивный и негативный контроль, контроль с преабсорбцией.

Позитивный контроль состоит в том, что по стандартно подобранной схеме иммуногистохимического окрашивания проводят срезы тканей, которые заведомо содержат исследуемый антиген. Срезы при этом должны заметно окрашиваться. *Негативный контроль* состоит в том, что при иммуногистохимической проводке ткани, в которой заведомо нет исследуемого антигена, не должно выявляться окрашивания. Этот же контроль можно провести и в другом варианте. Если окрашивать ткань, в которой исследуемый антиген заведомо есть, но при этом исключать один из важных этапов (например инкубацию с первыми или вторыми антителами), то продукты иммунных реакций выявляться не должны, то есть срезы должны остаться неокрашенными. *Контроль с преабсорбцией* основан на том, что меченые антитела должны терять свою реактивность, а срезы оставаться неокрашенными после инкубации меченых антител в растворе, содержащем избыток антигена к которому они вырабатывались.

Арсенал способов иммуногистохимического окрашивания в настоящее время стремительно увеличивается. Иммуногистохимия становится наиболее быстро развивающейся линией методологии в морфологии. Изначально дорогостоящие и недоступные практическому здравоохранению иммуногистохимические методы исследования внедряются в клиническую практику не только на светооптическом уровне. Предложено множество методов иммунохимического выявления тканевых антигенов на электронномикроскопическом уровне. Они различаются по характеру фиксации, использованию заливочных сред, разнообразию используемых меток.



ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Термин «электронная микроскопия» включает в себя весь комплекс методов подготовки материала (схема 3) и инструментальной техники, позволяющей исследовать микроскопически препараты с помощью электронного микроскопа.

13.1. Основные группы и принципы действия электронных микроскопов

Электронные микроскопы – это в настоящее время большая разнообразная группа микроскопов, объединенных тем, что для формирования изображения исследуемого объекта используются электроны. Основными типами электронных микроскопов являются: трансмиссионный электронный микроскоп с высоким напряжением, сканирующий электронный микроскоп, сканирующий трансмиссионный микроскоп и их модификации.

Трансмиссионный электронный микроскоп – это прибор для наблюдения и фотографирования, в котором, в отличие от светового микроскопа, вместо пучка света используется пучок электронов, а вместо стеклянных линз – электромагнитные (рис.19). Принцип его работы состоит в следующем: в высоком вакууме, создаваемом насосами (Н), раскаленный вольфрамовый катод (К) испускает электроны, которые затем получают ускорение в электромагнитном поле между катодом и анодом (А) и фокусируются на объекте (О) конденсорной линзой (КЛ). Электроны проходят через объект и рассеиваются. Линза объектива (ЛО) создает уве-

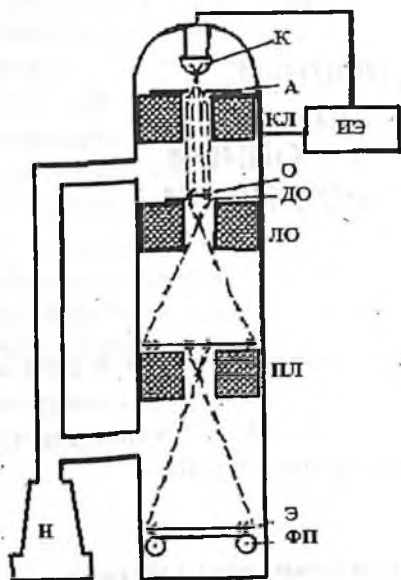


Рис.19. Принцип действия трансмиссионного микроскопа.

Н – насос, *К* – вольфрамовый катод, *А* – анод, *О* – объект, *КЛ* – конденсаторная линза, *ЛО* – линза объектива, *ПЛ* – проекционная линза, *Э* – флуоресцирующий экран, *ФП* – фотопластинка.

толщиной 0,2-0,3 мкм, а также определенные типы живых клеток в специальных камерах.

Сканирующий электронный микроскоп, в отличие от трансмиссионного, позволяет получать трехмерное изображение поверхностей. Подготовка материала к исследованию в сканирующем электронном микроскопе требует предварительного высушивания в критической точке и напыления образцов слоем тяжелого металла (золото, хром, палладий) для усиления контраста и придания структурам трехмерности.

Сканирующий трансмиссионный электронный микроскоп объединяет характеристики сканирующего и трансмиссионного

личный образ объекта. Фрагмент этого изображения проектируется проекционной линзой (ПЛ) на флуоресцирующий экран (Э) или фотопластину (ФП). Поскольку энергия электронов очень низка, электронная микроскопия требует очень тонких объектов или срезов.

Трансмиссионный электронный микроскоп высокого напряжения отличается от вышеописанного тем, что работает на высоком напряжении – 1000 кВ и более.

Это дает возможность получать более высокую разрешающую и проникающую способность. Такой микроскоп позволяет рассматривать срезы ткани

микроскопов и позволяет получать большее количество информации при меньшей электронной нагрузке.

Несмотря на огромные возможности, предоставляемые электронной микроскопией, в силу своей дороговизны она еще недостаточно широко используется в практической патоморфологии. Даже те практические лаборатории, которые имеют электронный микроскоп, предпочитают пока ограничиваться трансмиссионной микроскопией. Учитывая это при описании этапов подготовки материала для изучения в электронной микроскопии, мы не будем останавливаться на специфических для сканирующей микроскопии методиках (напыление, высушивание в критической точке).

13.2. Подготовка материала для электронномикроскопических исследований

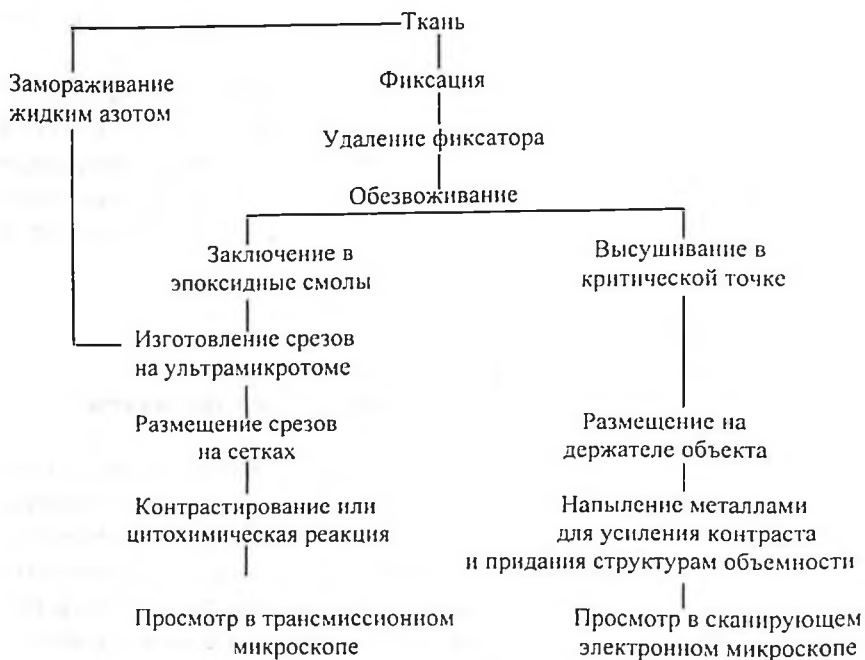
Принцип действия электронного микроскопа тот же, что и светооптического. При светооптическом исследовании используется поток световых лучей и формирование изображения зависит от степени поглощения света в различных участках объекта. В электронном микроскопе используется способность потока электронов рассеиваться при встрече с изучаемым объектом и формировать при этом изображение.

Основным преимуществом электронной микроскопии является ее высокая разрешающая способность.

Высокая разрешающая способность электронной микроскопии требует большей сохранности изучаемых структур.

Начинающиеся сразу после смерти или извлечения из организма изменения в тканевых структурах не сразу становятся заметными и значимыми при светооптических исследованиях. Постмертные изменения, не выявляемые на светооптическом уровне, часто делают невозможным использование материала в электронномикроскопических исследованиях. Учитывая это, необходимо максимально сокращать промежуток времени между смертью и забором материала, забором материала и фиксацией.

**Подготовка микропрепарата для изучения в электронной
микроскопии (Р.В. Крстич, 2001)**



В экспериментальных условиях фиксацию можно начинать методом перфузии до забора материала. Дофиксацию после этого проводят погружным методом.

Забор материала проводят быстро. После иссечения интересующего кусочка его переносят на пластмассовую пластинку в каплю фиксатора. Острым и тонким режущим инструментом ($\frac{1}{4}$ лезвия безопасной бритвы, закрепленной в зажиме) пилящими движениями без сильного нажима нарезают кусочек на кубики размером 0,5 - 1 мм. Подготовленные кусочки собирают в «пенициллиновые» флаконы, заполненные свежей порцией фиксатора.

В качестве фиксаторов в электронной микроскопии (ЭМ) используют жидкости, изотоничные по отношению к нормальным клеткам (0,2-0,3М, рН 7,3-7,6). Наибольшее распространение получили фиксаторы, в состав которых входят параформальдегид, тетраоксид осмия или глутаровый альдегид. Также используются фиксаторы на основе перманганата калия. Для приготовления фиксирующих жидкостей используют буферные растворы на бидистиллированной воде. Они позволяют фиксатору стабильно сохранять заданную кислотность. Осмотическое давление обычно повышают раствором сахарозы или растворами солей Na, K, Ca. Прописей приготовления фиксаторов очень много. Выбор определенной методики связан с особенностями исследуемых тканей, целями и задачами исследования.

13.2.1. Осмиевый фиксатор на веронал-ацетатном буфере

Для его приготовления первоначально готовят растворы А, Б и раствор тетраоксида осмия.

Раствор А:

1. Ацетат натрия – 9,7 г.
2. 5,5-диэтилбарбитурат натрия – 14,7 г.
3. Бидистиллированная вода – до 500 мл.

Раствор Б:

1. Хлорид натрия – 40,3 г.
2. Хлорид калия – 2,1 г.
3. Хлорид кальция безводный – 0,9 г.
4. Бидистиллированная вода – до 500 мл.

13.2.2. Раствор тетраоксида осмия

В зависимости от количества кристаллического тетраоксида осмия в ампуле отмеряют бидистиллированную воду в расчете на получение 2% раствора. Воду наливают в темную склянку, туда же помещают химически отмытую запаянную ампулу, предварительно сделав на ней надрез. Ампулу под слоем воды разбивают и размешивают содержимое склянки стеклянной па-

лочкой. Раствор готов к употреблению через 24 часа, его можно хранить длительное время в холодильнике. Раствор ядовит и летуч!

Состав фиксирующей жидкости (рН 7,2)

1. Раствор А – 50 мл.
2. Раствор Б – 1,7 мл.
3. 0,1 М раствор соляной кислоты – 5,5 мл.
4. Бидистиллированная вода – 3 мл.
5. 2% раствор тетраоксида осмия – 125 мл.

13.2.3. Фиксирующие жидкости, содержащие параформальдегид (Б. Уикли, 1975)

Для приготовления таких фиксаторов может использоваться только химически чистый порошкообразный параформальдегид. Не пригоден для этих целей поступающий в продажу 37-40% раствор формальдегида.

Параформальдегид в буфере Миллонига

Рабочие растворы: А. 2,26% $\text{NaH}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Б. 2,52% NaOH

Фиксирующий раствор: 41,5 мл раствора А

8,5 мл раствора Б, далее:

нагреть до 60-80°C. Добавить 2,0 г порошкообразного параформальдегида. Встряхивать до полного растворения. Довести рН до 7,2-7,4.

Профильтровать. Охладить.

Параформальдегид – глутаральдегид фиксатор

1. 2 г порошкообразного параформальдегида растворяют в 25 мл дистиллированной воды при 60-70°C при помешивании.
2. Добавляют 1-3 капли 1 М раствора едкого натра.
3. Охлаждают раствор.
4. Добавляют 5 мл 50% глутаральдегида.

5. Объем доводят до 50 мл, добавляя фосфатный буфер, рН 7,4-7,6. Итоговая рН 7,2 (приложение 3).

Следующим этапом подготовки материала к электронно-микроскопическому исследованию является обезвоживание.

Если заливочная среда смешивается со спиртом, то после обезвоживания кусочки исследуемого материала можно переносить в неполимеризованную заливочную смолу для пропитывания. Оптимальными для заливки и последующего изготовления срезов являются эпоксидные смолы (эпон, аралдит), полиэфирная смола вестопал. Реже используются водорастворимые среды аквон, гикольметакрилат, метилметакрилат.

13.2.4. Заливка в аралдит (Б. Уикли, 1975)

После обезвоживания в спирте ткань проводят через эпоксипропан и помещают в смесь для заливки на срок от 2 до 20-24 часов при комнатной температуре. Возможно, для большей уверенности в том, что ткань полностью пропиталась, лучше оставлять ее в заливочной смеси на ночь. Удобные сосуды для пропитки можно изготовить из пластиковой формочки для приготовления льда. После пропитки ткань помещают в свежую заливочную среду, которая полимеризуется в течение приблизительно 24 часов при 60°C. Если заливку проводят в желатиновых капсулах, то их необходимо перед употреблением просушить в течение примерно 1 часа при температуре 60°C. Полиэтиленовые капсулы, формочки или ванночки для заливки не нуждаются в предварительной просушке.

Метод 1

Запасной раствор: смесь равных объемов аралдита СУ212 и уплотнителя НУ964. Чтобы заливка была хорошей, эту смесь нужно тщательно перемешать, однако в ней не должно быть пузырьков воздуха, поскольку она может затвердеть. Для перемешивания лучше всего пользоваться магнитной мешалкой. Перемешивание облегчается, если составные части смесей нагреть до 60°C. Данный запасной раствор устойчив и его можно хранить

при комнатной температуре в течение многих недель (в том случае, когда предстоит резать очень твердую ткань, 1/10 часть НУ964 можно заменить на МНА).

Заливочная среда:

20 мл запасного раствора,

0,4 мл DY064 (катализатор или ускоритель),

0,6 мл дибутилфталата (пластификатор).

Данная заливочная среда позволяет получить блок средней твердости. Консистенция блока регулируется добавлением большего или меньшего количества пластификатора.

Сосуд с заливочной средой прикрепляют к вращающемуся диску или помещают во вращающийся барабан; перемешивание среды осуществляют при умеренной скорости вращения в течение 2 часов перед заливкой. Если после заливки ткани еще остается какое-то количество заливочной среды, то ее можно хранить несколько недель в закрытом пробкой сосуде, который помещается в морозильную камеру холодильника или в условия глубокого замораживания. Хранить заливочную среду при низкой температуре можно до тех пор, пока есть уверенность, что в сосуд со средой не проникла влага. Непосредственно перед употреблением среду согревают в термостате при 60°C для уменьшения вязкости и для того, чтобы удалить следы влаги перед открыванием сосуда.

Метод 2

Все процедуры такие же, как и в методе 1. Различаются лишь компоненты запасного раствора и заливочной среды.

Запасной раствор: 10 частей аралдита 502

7 частей НУ964 (DDSA)

Заливочная среда: смешать запасной раствор с 1,5-2% раствором DY064 (DMP-30).

Если DY064 свежий, достаточно 1,5% раствора, если он старый, возможно, следует добавить 2% раствора. Эта пропись позволяет получить блок средней твердости. Если желательно иметь более твердый или более мягкий блок, надо изменить количество уплотнителя (НУ964) в запасном растворе.

13.2.5. Заливка в эпон (Б.Уикли, 1975)

Довольно большая гигроскопичность эпона затрудняет резку изготовленных из него блоков, в особенности при сырой погоде. Чтобы избежать попадания влаги из воздуха в запасные растворы эпона, их нужно хранить в плотно закупоренных флаконах. По той же причине нужно закрывать сосуды при пропитывании и заливке ткани.

Наиболее часто применяется метод заливки в модификации, предложенной Люфтом. Для заливки необходимы два запасных раствора, которые могут храниться примерно 4 месяца при температуре 4°C.

Запасной раствор 1: эпон 812 - 62 мл
DDSA (HY964) - 100 мл

Запасной раствор 2: эпон 812 - 100 мл
MNA - 89 мл

Первый раствор дает очень мягкие блоки, второй – очень твердые; таким образом, для получения желаемой степени твердости блока эти растворы смешивают. Блок средней твердости получается при смешивании 7 частей раствора 1 и 3 частей раствора 2.

После обезвоживания ткань помещают на 1 час в смесь равных объемов этилового спирта и заливочной среды, содержащей 1,5-2% DY064 (DMP-30) в качестве катализатора. Затем ткань переносят в предварительно просушенные желатиновые капсулы (или иные сосуды для заливки), заполненные свежей заливочной средой, содержащей катализатор. Полимеризация проводится при 60°C в течение 20-24 часов.

Оставшуюся заливочную среду можно хранить в морозильной камере холодильника или при глубоком замораживании, как это было указано для аралдита.

Каждая заливочная среда диктует особенности проводки. Вместе с тем основные этапы обработки материала остаются неизменными. Одну из таких обобщенных схем обработки мы и приводим ниже:

1. Быстро забирают материал.

2. Фиксируют или дофиксируют материал погружным методом в 2% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере.

3. Промывают кусочки в фосфатном буфере – двукратно по 20 минут.

4. Дофиксируют в 1% растворе тетраоксида осмия – 2 часа (в вытяжном шкафу!).

5. Промывают в фосфатном буфере – двукратно по 20 минут.

6. Обезвоживают последовательно: в 50% спирте – 15 минут, в двух сменах 70% спирта – по 20 минут, в двух сменах 96% спирта – по 20 минут, в двух сменах 100% спирта – по 30 минут.

7. Выдерживают в двух сменах окиси пропилена по 10 минут.

8. Пропитывают последовательно в смеси смол с добавлением окиси пропилена. Смесь смол готовят соединением 10 мл аралдита М, 12 мл эпона 812, 30 мл уплотнителя ДДСН и 10 капель катализатора ДМП.

Схема пропитки:

Смесь смол – окись пропилена 1:2 – 60 минут.

Смесь смол – окись пропилена 1:1 – 60 минут.

Смесь смол – окись пропилена 2:1 – 30 минут.

9. Для заливки готовят свежую порцию смеси смол. Устанавливают половинки желатиновых капсул в пластиковых подставках. Капсулы заполняют смесью смол при помощи шприца без иглы. Препаровальной иглой в капсулы переносят кусочки пропитанного материала, при необходимости ориентируют их. Подставки с заполненными капсулами размещают в термостате на 1 час при 50°C. Затем капсулы накрывают крышками и оставляют на 24 часа при 60°C. Подставки – штативы легко изготавливаются прожиганием упорядоченных рядов лунок нагретой стеклянной палочкой в прямоугольных кусочках пенопласта. Резку полученных блоков желательно начинать через сутки после окончания полимеризации.

13.3. Приготовление и окрашивание полутонких срезов

Полутонкими называют срезы, которые по толщине занимают промежуточное положение между толстыми срезами (5-10 мкм), изготавливаемыми с блоков, залитых в парафин или целлоидин с помощью микротомы, и тонкими срезами (50-100 нм), которые готовятся с использованием ультрамикротомы с блоков, залитых в эпоксидные смолы. Толщина полутонких срезов колеблется между 0,5 и 2 мкм.

Изучение полутонких срезов является предварительным этапом электронной микроскопии, оно позволяет рационально и точно выбрать участок для ультратомии. Кроме того, изучение полутонких срезов может лечь в основу самостоятельного светооптического исследования. При заливке в смолу клеточные компоненты сохраняются лучше, чем при заливке в парафин или целлоидин. Меньшая, по сравнению с парафиновыми срезами, толщина позволяет получать более четкое изображение отдельных структур. Полутонкие срезы можно окрашивать с применением гистохимических, в том числе иммуноцитохимических методик, исследовать в проходящем и отраженном свете.

Для изготовления полутонких срезов необходимо предварительно произвести заточку блока, так же как и для ультратомии (см. следующую подглаву), но с большим размером пирамидки. Пирамидка, как правило, включает весь залитый кусочек. Удобно, если со всех сторон кусочка будет оставаться еще небольшое количество свободной заливочной среды. Форма среза в виде четырехугольника с двумя прямыми углами, одним острым и одним тупым углом позволяет легко ориентироваться и достаточно точно находить выбранный в срезе участок для прицельной ультратомии.

Полутонкие срезы готовят на ультрамикротоме в режиме низкой скорости или вручную сухим стеклянным ножом, но можно резать и в ванночку с водой. Для лучшего расправления срезы можно монтировать на предметные стекла в капле 100% спирта. С этой же целью на режущий край ножа можно помещать каплю глицерина. Если срезы режутся ножом с ванночкой, то их легко монтировать на предметные стекла в каплю воды.

Из ванночки срезы переносятся проволочной петлей или препаровальной иглой. Предметные стекла с размещенными на них срезами помещают в термостат или на нагреваемый столик. После высыхания срезы можно окрашивать и микроскопировать. Поскольку полутонкие срезы окрашивают обычно без удаления заливочной среды, заключение срезов в светопреломляющие среды и использование покровных стекол необязательно.

Простым и очень информативным методом окраски полутонких срезов является окрашивание в 1% растворе толуидинового или метиленового синего. Срезы можно сначала перекрасить, а потом дифференцировать 70% спиртом до исчезновения фонового окрашивания. Усилить окрашивание можно подогреванием красящего раствора или предварительной обработкой срезов 3-5% раствором перекиси водорода.

Для окрашивания полутонких срезов без извлечения смолы можно использовать и многоцветные методы.

13.3.1. Окрашивание полутонких срезов (Hayat, 1986)

Приготовление красящих растворов

Раствор А: метиленовый синий – 0,13г

Азур II – 0,02 г

Глицерин – 10 мл

Метанол – 10 мл

Фосфатный буфер (рН 7,0) – 30 мл

Дистиллированная вода – 50 мл

Раствор Б: основной фуксин – 0,1 г

50% спирт – 10 мл

Дистиллированной воды – 90 мл

Методика окраски

1. Окрашивают в растворе А с нагревом до 65°C – 20-30 минут.
2. Промывают водой.
3. Окрашивают в растворе Б – 1-3 минуты.
4. Промывают водой, высушивают.

Удаление смолы делает возможным применение многих методов окрашивания, в том числе иммуноцитохимических.

13.4. Приготовление и контрастирование ультратонких срезов

Ультратонкие срезы – это срезы, пригодные для исследования в трансмиссионном электронном микроскопе. Их обычная толщина – 50-100 нм.

Обязательным условием получения качественных ультратонких срезов является хороший нож. Ультратонкие срезы готовят стеклянным или алмазным ножом. Для изготовления ножей можно использовать приборы – найфмейкеры, но можно изготовить ножи и с помощью стеклореза и щипцов. В качестве материала для изготовления ножей удобно использовать полоски стекла шириной 2,5 см и толщиной около 6 мм.

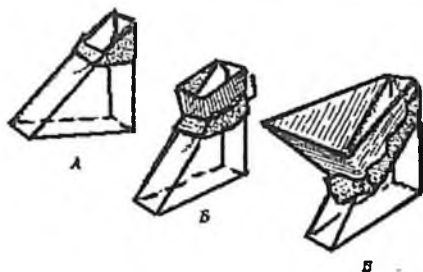


Рис.20.

Ванночки для стеклянных ножей

Предназначенные для изготовления ножей полоски стекла моют, высушивают, но не вытирают. Сначала из полосок нарезают квадратные кусочки со стороной 2,5 см. Для изготовления ножа по диагонали такого квадрата, отступая от угла 2-3 мм, проводят царапину стеклорезом. Плавным нажатием

щипцов квадратик разламывают на два треугольника.

В стеклянном ноже (рис.20) принято различать переднюю поверхность (во время резания она обращена к блоку) и заднюю поверхность, образованную при разломе по диагонали (во время резания она обращена к исследователю и образует дно ванночки). По задней поверхности ножа проходит в виде небольшого возвышения линиялома.

Необходимо соблюдать меры предосторожности, чтобы случайно не испортить нож, в частности не прикасаться к режущему краю, хранить нож в закрытой емкости не более нескольких часов.

Ультратомию всегда проводят с таким расчетом, чтобы в ультратонком срезе была представлена не случайная зона залитого кусочка, а зона, имеющая наибольший интерес для исследования. Ее подбирают по результатам просмотра полутонкого среза. Ориентировка основывается на идентичности внешнего контура среза и лицевой поверхности блока. Желательно блок для полученного среза затачивать так, чтобы последний имел форму трапеции. Дополнительными ориентирами при выборе участка для ультратомии могут быть оставляемые ножом царапины, заметные и на срезе, и на блоке.

После просмотра полутонкого среза под микроскопом и выбора участка для тщательной ультратомии проводят перезаточку блока для получения ультратонких срезов.

Ультратонкие срезы невозможно сделать сухим ножом. Для того, чтобы срез по мере его образования отрывался от края ножа и расправлялся, используют силу поверхностного натяжения жидкости (дистиллированная вода, 10-20% водный раствор спирта или ацетона). С этой целью на задней стороне ножа монтируют ванночку из металла, пластмассы или изоляционной ленты. Герметизацию ванночек проводят расплавленным воском.

13.4.1. Последовательность операций ультратомии (Б.В. Вторин, 1996)

1. Рукоятки грубой и тонкой подводки устанавливают в исходное положение.
2. Штангу образца закрепляют в средней точке рабочего хода.
3. Закрепляют блокодержатель с блоком.
4. Устанавливают нож.
5. Устанавливают угол наклона передней поверхности ножа и лицевой поверхности блока (2-5°).

6. Устанавливают середину высоты лицевой поверхности блока на уровне режущего края ножа.

7. Получают изображение блока в стереомикроскопе.

8. Подводят нож так, чтобы видеть режущий край вместе с блоками.

9. Направляют свет так, чтобы при подведении ножа по лицевой поверхности блока появилось отражение ножа.

10. Поворачивая блокодержатель и нож, добиваются того, чтобы отражение было параллельно режущему краю, а также верхней и нижней границам среза.

11. Боковым смещением ножа устанавливают выбранный участок режущего края.

12. Подводят нож так близко, чтобы между его краем и отражением на блоке осталась узкая щель.

13. Доводят уровень воды в ванночке до нормы.

14. Включают движения штанги.

15. Получают срез. Первый срез слишком толстый, поэтому его следует отстранить ресничкой от края ножа. К этому бракованному срезу можно прикасаться ресничкой и даже вынимать ею срез из ванночки, с теми же срезами, которые предназначены для просмотра, манипулируют следующим образом: действуя ресничкой как веслом, создают в ванночке движение воды с таким расчетом, чтобы оно обеспечивало перемещение срезов в нужном направлении.

16. Устанавливают желаемую скорость резания, можно начать с 2-3 мм/с. Включают автоматическое движение штанги и автоматическую подачу.

17. После появления первых ультратонких срезов регулируют их толщину, которую определяют (конечно, приблизительно) по цвету интерференции срезов в ванночке. При использовании сред с показателем преломления около 1,5 (эпоксидные смолы, метакрилат) срезы толщиной менее 60 нм имеют серый цвет, 60-90 нм – серебристый, 90-150 нм – золотистый, 150-190 нм – красный, 190-240 нм – голубой.

18. Проверяют качество срезов (ровность ленточки, равномерность толщины, отсутствие царапин от ножа). Если для его

улучшения нужно изменить скорость резания, то это можно сделать только ко время возвратного (не рабочего) хода штанги.

19. После получения достаточного количества срезов выключают движения штанги и автоматическую подачу, отстраняют ленточку срезов от режущего края и стенок ванночки.

20. Расправляют срезы хлороформом. Для этого полоску фильтровальной бумаги, смоченную хлороформом, держат несколько секунд над срезами.

21. Опускают на срезы сетку или бленду.

22. Высушивают срезы, прикасаясь краем сетки к фильтровальной бумаге, и помещают в кассету или чашку Петри «лицом» вверх.

23. Для смены режущего участка ножа его отводят немного назад, отключают подачу, блок закрепляют в среднем положении. Боковым смещением устанавливают напротив блока выбранный участок режущего края. Понижают уровень воды в ванночке, для того чтобы получить отражение ножа на лицевой поверхности блока. Дальнейшие операции осуществляют в описанной выше последовательности.

13.4.2. Трудности, возникающие при ультратомии, их причины и способы преодоления (Б.В. Втюрин, 1996)

Ультратонкие срезы получают только после более или менее продолжительного периода неудач начинающего ультратомиста. Приведенное ниже описание возникающих трудностей и способов их преодоления направлено на уменьшение продолжительности этого периода.

<i>Погрешность</i>	<i>Вероятная причина</i>	<i>Возможный способ устранения</i>
Включена автоматическая подача, штанга со-вершает рабочие	1) «лицо» блока трется о переднюю поверхность ножа; 2) нож, блок, держатель ножа или держатель блока плохо закреплены;	1) увеличить угол наклона ножа; 2) закрепить, туго затянуть все винты; 3) устранить причину вибраций и изменений температуры (укрепить и утяжелить стол, прекратить ра-

движения, а срезов нет	3) вибрация и/или изменения температуры; 4) исчерпана возможность механизма подачи; 5) затупился режущий край; 6) лицевая поверхность блока отдалена от режущего края	боту моторов по соседству, не ходить во время работы прибора, устранить сквозняки, отдалить нагревательные приборы); 4) установить исходное положение механизма; 5) сменить участок режущего края или нож; 6) подвести нож к блоку
Срезы разной толщины	1) нож, держатель ножа или блока не закреплены; 2) срезы слишком велики; 3) неправильный угол клиренса; 4) высока скорость резания; 5) тупой режущий край; 6) слишком уменьшена подача из-за стремления получить очень тонкие срезы; 7) нестандартны циклы ультразвука; 8) вибрации, сквозняки; 9) слишком мягкий блок; 10) дефектный механизм или неправильная установка прибора	1) закрепить нож; 2) уменьшить размер пирамидки; 3) изменить угол; 4) уменьшить скорость; 5) сменить участок края или нож; 6) увеличить подачу, а потом попытаться снова уменьшить ее; 7) отрегулировать прибор; 8) устранить причину; 9) провести дополнительную полимеризацию при 60-80°C в течение 24 часов. Сменить блок; 10) починить, установить правильно
Неравномерная толщина срезов	1) тупой нож (граница между зонами разной толщины перпендикулярна режущему краю); 2) неоднородная консистенция блока (есть «пустая» пластмасса); 3) вибрация (граница между зонами разной толщины параллельна режущему краю); 4) увлажнение отвердителя; 5) неправильное расположение ножа и/или блока по высоте	1) сменить участок режущего края или нож; 2) изменить пирамидку, освободиться от «пустой» смолы; 3) устранить вибрацию; 4) сменить отвердитель; 5) правильно расположить нож и блок
Срез остается на блоке	1) высокий мениск; 2) мал угол наклона ножа; 3) грязь на блоке или ноже; 4) капля жидкости на лицевой	1) понизить уровень воды в ванночке; 2) увеличить наклон ножа вперед; 3) очистить блок бумагой для

	<p>вой поверхности блока; 5) капля жидкости на передней поверхности ножа; 6) слишком мягкий блок; 7) лицевая поверхность блока наэлектризована; 8) не закреплены блок и/или нож</p>	<p>оптики, заменить нож; 4-5) удалить воду фильтровальной бумагой; 6) прогреть при температуре 60-80 С в течение 24 часов, сменить блок; 7) прикоснуться влажной бумагой к лицевой поверхности блока, увеличить влажность в комнате; 8) закрепить нож и блок</p>
Лицевая поверхность блока увлажняется	<p>1) капля жидкости на передней поверхности ножа; 2) высокий уровень воды в ванночке; 3) низкая скорость резания; 4) грязь на режущем крае</p>	<p>1) удалить каплю бумагой; 2) понизить уровень воды; 3) увеличить скорость резки; 4) очистить нож фильтровальной бумагой, смоченной спиртом либо ацетоном, или сменить нож</p>
Ленточка не образуется	<p>1) высокий мениск и ранний отрыв срезов от режущего края; 2) верхняя и нижняя границы среза не параллельны; 3) верхняя и нижняя границы среза не прямые; 4) низкая скорость резания; 5) блок или нож наэлектризованы; 6) нестабильны циклы ультразвука; 7) верхняя граница среза не параллельна режущему краю; 8) ведущий конец ленточки уперся в стенку ванночки; 9) грязь на режущем крае</p>	<p>1) понизить уровень воды; 2-3) перезаточить пирамидку; 4) увеличить скорость резки; 5) коснуться блока влажной бумагой, чтобы снять заряд, увеличить влажность в комнате; 6) починить, отрегулировать прибор; 7) переориентировать или перезаточить пирамидку; 8) укоротить или сцентрировать ленточку; 9) очистить или сменить нож</p>
Ленточка кривая	<p>1) верхняя и нижняя границы среза не параллельны; 2) верхняя и нижняя границы среза не прямые; 3) в различных зонах режущего участка нож неодинаково острый; 4) верхняя и нижняя границы среза не параллельны режущему краю</p>	<p>1-2) перезаточить пирамидку; 3) сменить режущий участок или нож; 4) переориентировать блок</p>

Срезы плохо видны	1) много воды в ванночке; 2) неправильный угол освещения	1) понизить уровень воды; 2) отрегулировать свет
Срезы с царапинами	1) мелкие зазубрины на режущем крае; 2) грязный режущий край; 3) твердые частицы в материале	1) сменить участок режущего края или нож; 2) очистить режущий край или сменить нож; 3) перзаточить блок, использовать алмазный нож
Срезы мнутся или прилипают к режущему краю	1) низкий мениск, сухой режущий край; 2) грязный режущий край; 3) тупой режущий край; 4) мал угол наклона ножа	1) поднять уровень воды; 2) очистить или сменить нож; 3) сменить участок режущего края или нож; 4) увеличить угол наклона ножа
На срезах складки	1) плохое пропитывание; 2) тупой нож; 3) срез большого размера; 4) не закреплен нож, блок	1) дополимеризовать блок в течение 24 ч при 60- 80°C, сменить блок; 2) сменить участок режущего края или сменить нож; 3) уменьшить размер среза; 4) закрепить нож и блок
В срезах дефекты (отверстия)	1) пузырьки воздуха в смоле; 2) грязный режущий край; 3) кусочек твердого материала в образце	1) перзаточить пирамидку, срезать на некоторую глубину лицевую сторону блока, сменить блок; 2) очистить, сменить участок режущего края, сменить нож; 3) использовать более плотную заливку, соответствующую наиболее плотной порции образца
Образец (ткань) мнется и выкрашивается из среза	1) плохое пропитывание	1) увеличить продолжительность пропитывания, уменьшить размер кусочков, пропитывать последней порцией смолы в вакууме
Четвер – равномерные колебания толщины среза с «длинной волной» меньше 1 мкм (виден	1) тупой нож; 2) твердый блок; 3) частые или неритмичные циклы ультрамикротомы; 4) велик угол наклона ножа; 5) неправильно выбрана скорость резания; 6) слишком высокая пира-	1) сменить участок режущего края или нож; 2) изменить соотношение компонентов смолы с целью уменьшения твердости блока; 3) снизить частоту циклов, отрегулировать прибор; 4) уменьшить угол наклона ножа;

только в электронном микроскопе)	мидка; 7) срез больших размеров	5) подобрать оптимальную скорость; 6) перезаточить блок, сделать пирамидку низкой с широким основанием; 7) уменьшить площадь среза
Блок ломкий	1) избыток отвердителя	1) уменьшить содержание отвердителя, включить в смесь дибутилфталат или увеличить его содержание
Блок бесцветный	1) старый катализатор	1) сменить катализатор
Блок мягкий	1) неполная полимеризация; 2) мало катализатора; 3) неправильно подобраны компоненты смеси.	1) дополимеризовать при 60-80°C; 2) увеличить содержание катализатора; 3) с помощью метода проб имеющейся партии компонентов смолы найти их оптимальное соотношение

13.4.3. Окрашивание (контрастирование) ультратонких срезов

Контрастирование тетраоксидом осмия при фиксации описано в главе 12.2. Наиболее распространено контрастирование путем введения контрастных веществ в срезы. Основные трудности, возникающие при контрастировании – низкая специфичность и образование осадков. Специфичность можно повысить путем подбора оптимальных концентраций веществ, pH, продолжительности обработки. Осадки на срезах можно удалять обработкой 10% уксусной кислотой в течение 5 минут.

Срезы можно контрастировать на сетках или блендах в чашках Петри. В чашки сначала наливают слой парафина и после остывания капают растворы на него. При этом капли на растекаются.

Уранилацетат в фиксированных образцах избирательно контрастирует структуры, содержащие нуклеиновые кислоты. Для окрашивания уранилацетатом капли раствора помещают в чашку Петри и на эти капли срезами вниз опускают сетки. В ка-

честве базового режима контрастирования рекомендуется применение насыщенного водного раствора уранилацетата в течение 5-20 минут при комнатной температуре. После контрастирования сетки со срезами промывают. Если после уранилацетата предполагается контрастирование свинцом, то срезы нужно промывать в воде без углекислого газа (после кипячения). Растворы уранилацетата разрушаются на свету!

Уранилацетат может быть использован в качестве единственного контрастного вещества или в сочетании со свинцом. Свинец контрастирует многие клеточные компоненты.

Контрастирование проводят также, как уранилацетатом, то есть на каплях раствора.

13.4.4 Рабочий раствор свинца (E.Reynold, 1963)

Смешивают 1,33 г нитрата свинца, 1,76 г цитрата свинца, 30 мл свежekiпяченной дистиллированной воды. Встряхивают 30 минут. После получения однородной суспензии добавляют 8 мл 1 N (4%) гидроксида натрия. Раствор доводят дистиллированной водой до 50 мл (рН 12,0). Для контрастирования используют матричный или разбавленный в 2-100 раз 0,04% гидроксидом натрия раствор. Продолжительность контрастирования – 5-30 минут.

13.4.5. Контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой

Для избирательного прокрашивания парамембранных нейрофиламентозных образований используется контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК). Окраска ткани мозга спиртовым раствором ФВК значительно улучшает контраст системы субсинаптических единиц межнейрональных контактов. В основе селективного контрастирования системы субсинаптических единиц лежит взаимодействие ФВК с белками парамембранных микрофиламентов цитоскелета.

После перфузионной фиксации 1% раствором глутарового альдегида и 4% раствором параформальдегида с сахарозой (5%) в течение 15 минут с дофиксацией погружным способом в течение

ние 1,5 часа при 4° С, ткань промывают в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) с сахарозой в течение 1 суток. Далее следует дегидратация в спиртах восходящей концентрации. На стадии 100% этанола материал контрастируют в 5% спиртовом растворе ФВК в течение 3 часов, затем отмывают в 100% спирте 45 минут, после чего заключают в смесь эпон-аралдит или другую среду.



РАДИОАВТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Радиоавтография – это цитохимическая методика определения локализации биологически активных веществ, участвующих в метаболизме клетки, посредством радиоактивных изотопов, в частности ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{45}Ca , ^{125}I и других (схема 4).

Изучаемые при радиоавтографическом исследовании препараты называются радиоавтографами. Для их приготовления в исследуемый материал предварительно вводят радиоактивное вещество. Затем из этого материала готовят любой морфологический препарат – срез, слой культуры клеток, мазок, отпечаток. Для определения степени радиоактивности определенных структур (в зависимости от сродства вводимого радиоактивного вещества к химическим соединениям тканей) используют фотографический способ регистрации. На препарат наносят фотослой – фотопленку или фотоэмульсию. Радиоактивное вещество преобразует гомогенные соединения серебра фотослоя в кристаллы с образованием центров скрытого изображения. После проявки центр изображения обнаруживается визуально как потемнение. Метод радиоавтографии позволяет проводить как качественные, так и количественные исследования. Распределение радиоактивных веществ можно оценивать как светооптическими, так и электронномикроскопическими методами исследования.

Путь введения радиоактивных веществ подбирается в зависимости от объекта изучения и изучаемого процесса. В экспериментах метку чаще всего вводят в сосудистое русло. Если животное крупное или метка слишком дорога, то более выгодным будет местное введение препарата. Например, при исследовании

структур ЦНС экономичней вводить меченый радионуклеид в желудочковую систему мозга, при изучении почек – в аорту. При исследовании извлеченного из организма материала, исследуемый образец некоторое время инкубируют в питательной среде, содержащей метку, при температуре тела. Такой прием позволяет предотвратить на короткое время развитие некротических изменений в извлеченных тканях и включиться в это время радионуклеиду в тканевые структуры.

Доза вводимого радиоактивного вещества подбирается в зависимости от особенностей изучаемого объекта, целей и задач эксперимента.

Длительность присутствия в исследуемой ткани радиоактивной метки определяется целями и задачами исследования. Например, если выявляются места синтеза или связывания какого-то вещества, то воздействие должно быть непродолжительным, так как синтезируемые вещества могут перемещаться из участков синтеза или первоначального накопления. Если же задачи исследования предполагают изучение путей миграции интересующих веществ, то необходимо исследовать препараты с возрастающими сроками присутствия радионуклида. Это позволяет отражать отдельные этапы процесса.

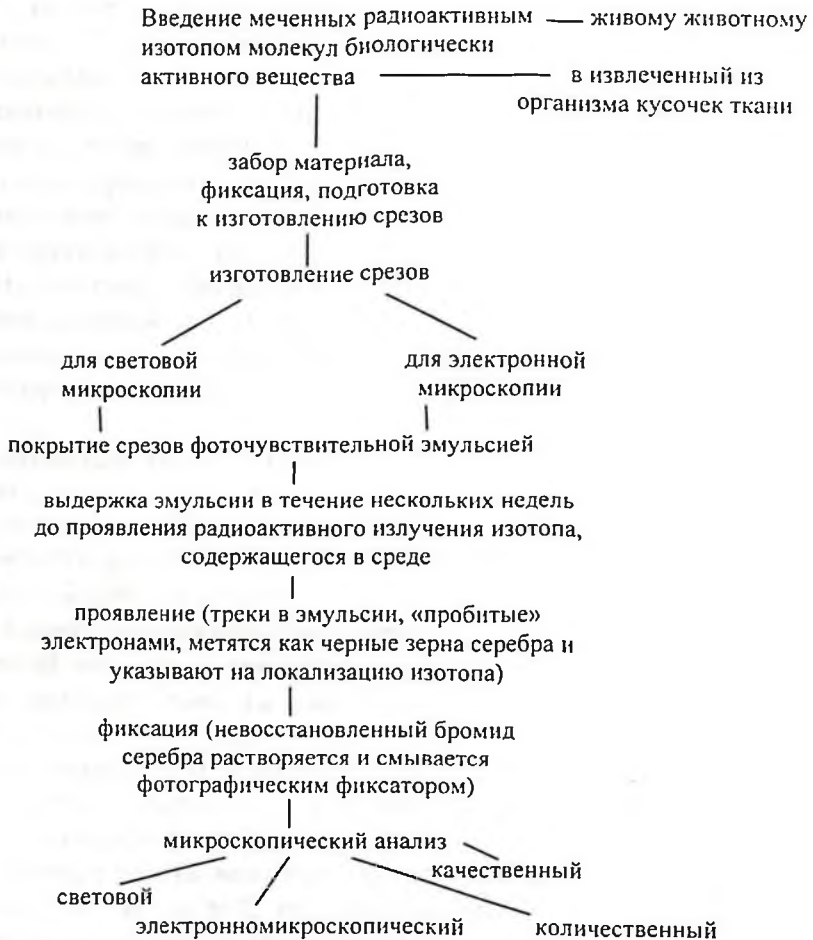
Подготовка тканей к исследованию, изготовление препаратов проводят по традиционным морфологическим методикам. Однако, следует учитывать и некоторые особенности. В процессе фиксации, обезвоживания, заливки, изготовления препаратов необходимо следить за сохранностью исследуемого макромолекулярного вещества или вещества, связывающего введенный радионуклеид. Для предотвращения появления фонового окрашивания необходимо освобождать ткань от несвязанной метки. Применяемые при обработки реактивы не должны оказывать воздействие на фотослой.

Фотослой над препаратами формируют нанесением ядерных фотоэмульсий М или Р. Фотоэмульсии М и Р различаются размерами получаемых зерен серебра. Эмульсии наносят на препарат жидкими в темном помещении, используя красные или желто-зеленые фильтры.

Емкость, конфигурация и размеры которой позволяют удобно располагать в ней предметные стекла, помещают на водяную баню при 42°C. При постоянном нагреве и медленном помешивании расплавляют фотоэмульсию в дистиллированной воде или 0,02% растворе бромиды калия. Соотношение эмульсии и растворителя, в зависимости от желаемой толщины фотослоя, может быть 1:3-1:10. Для предотвращения фонового окрашивания можно добавлять глицерин (до 1%). Для большей текучести эмульсии можно добавлять 1-2 капли любого поверхностно-активного вещества. После полного расплавления эмульсию фильтруют, затем погружают в нее предметные стекла со срезами или мазками. Все части стекла, не содержащие срез или мазок, тщательно протирают. Затем препараты высушивают, располагая горизонтально, срезами вверх. После высыхания препараты хранят в светонепроницаемых контейнерах при температуре 2-4°C.

В зависимости от условий эксперимента время экспозиции составляет от нескольких часов до нескольких месяцев. По окончании экспозиции препараты проявляют. Чаще всего используют проявитель Д-19. Для его приготовления в 1000 мл дистиллированной воды растворяют 2,2 г метанола, 96 г безводного сульфата Na, 8,8 г гидрохинона, 20 г карбоната натрия, 5 г бромиды калия. Раствор устойчив в течение 3 месяцев. Перед использованием рабочий раствор разводят дистиллированной водой в соотношении 1:2, проявляют в течение 3 минут при 20°C. При появлении выраженного фонового окрашивания меняют время проявки, температурный режим, степень разбавления рабочего раствора. Для закрепления фотослоя препаратов используют 25% раствор тиосульфата натрия. После промывания препараты окрашивают и исследуют. Для исключения возможных ошибок, связанных с неспецифическим фоновым окрашиванием, параллельно с исследуемым изучают контрольные препараты.

Основные этапы подготовки материала к радиоавтографическому исследованию



Холодный контроль предполагает изучение аналогичного материала, прошедшего ту же обработку, что исследуемый, но без введения радиоактивной метки. Радиографический контроль исключает фоновое окрашивание, связанное с режимом фотоподготовки и используемыми фотоматериалами.

Все виды анализа радиоавтографов при светооптическом исследовании возможны путем обычной микроскопии в проходящем и отраженном свете. Причем предпочтителен метод отраженного света.

Методы электронномикроскопической и светомикроскопической радиоавтографии принципиально сходны, однако электронная микроскопия отличается значительно большей технической сложностью и трудоемкостью. Преимуществами же этого метода является большая, по сравнению со светооптической радиоавтографией, разрешающая способность и возможность получить радиоавтограф над электронномикроскопическим срезом, представляющим гораздо более детальную картину строения клетки по сравнению со срезом, используемым в световой микроскопии.



ГЛАВА 15

ВИТАЛЬНОЕ ОКРАШИВАНИЕ

Методы витального окрашивания нашли свое применение преимущественно в экспериментально-исследовательской работе. Они основаны на неравномерном распределении введенных прижизненно в организм животного красителей. В настоящее время для прижизненного окрашивания используются различные красители: метиленовый синий, синий Эванса, индигокармин, нейтральный красный, биологическая взвесь туши.

Витальные красители вводятся внутривенно через тонкий полиэтиленовый катетер в виде 0,5% смеси, приготовленной на физиологическом растворе, из расчета 5 - 10 мг сухого красителя на 100 г веса животного.

Не являясь естественными компонентами крови, витальные красители сравнительно быстро покидают сосудистое русло и выходят в окружающую соединительную ткань преимущественно в области посткапиллярно-венулярного отдела микрососудистого русла. Высокая способность сосудистой стенки посткапилляров и венул пропускать витальные красители объясняется смещением градиента проницаемости сосудистой стенки в посткапиллярно-венулярный отдел. Однако, это касается медленно диффундирующих красителей, как правило, связанных с белковыми фракциями крови. В противоположность им, эскулин, свободно циркулирующий в крови, покидает кровеносное русло главным образом в его артериальном звене. Нейтральный красный также проникает в ткани преимущественно в области артериол и артериальной части капилляров и быстро поглощается макрофагами. Поэтому, вероятно, проникновение виталь-

ных красителей через сосудистую стенку зависит не только от градиента проницаемости и состояния гистогематического барьера, но и от диффузионной характеристики самого красителя и его способности связываться с белками крови. При действии раздражителя со стороны крови выявляется повышение проницаемости стенки сосудов, характеризующееся массивным выходом витальных красителей из крови в окружающие ткани. Повышение проницаемости сосудистой стенки посткапилляров и венул сопровождается усилением фагоцитарной активности эндотелиальных клеток, которое характеризуется резким их набуханием и активным интрацеллюлярным накоплением витальных красителей.

Для дифференциальной диагностики нормальных и поврежденных клеток обычно используют витальную окраску нейтральным красным. При этом способе окраски неповрежденные клетки аккумулируют краситель в виде гранул, а поврежденные клетки утрачивают эту способность и окрашиваются диффузно. Предложены методики двойной витальной окраски, позволяющие более точно дифференцировать состояние клеток. Наилучшие результаты дает смесь нейтрального красного и азура-1. Предлагается применять нейтральный красный в концентрации 0,05%, а азур-1 – 0,1%. Растворы этих красителей готовятся отдельно на дистиллированной воде, а затем, перед экспериментом, соединяются в соотношении 10 частей нейтрального красного и 3 части азура-1. Полученный раствор смешивают с равным количеством двойного солевого раствора Рингера. Окраска производится в чашках Петри в течение 1 часа при комнатной температуре. В неповрежденных клетках происходит интенсивное накопление гранул нейтрального красного, ядро остается неокрашенным. Патологически измененные клетки окрашиваются азуром-1 в синий цвет, причем ядро окрашивается более интенсивно, чем цитоплазма.

Для окрашивания трипановой синью необходимо приготовить раствор красителя в физиологическом растворе. В 100 мл дистиллированной воды растворяют 0,9 г химически чистого (не бытового!) хлорида натрия, затем добавляют 1 г трипановой си-

ни. Подогревают до 30-35°C. Крысам, лягушкам, мышам краситель вводят под кожу или в брюшную полость, крупным животным – внутривенно. Через 2-7 суток животное умерщвляют любым разрешенным способом. Забранный материал фиксируют в 10-20% формалине. Готовят замороженные срезы или, после заливки, парафиновые. Микроскопировать такие срезы можно без докраски или с подкраской кармином. Прижизненное окрашивание можно сочетать с любыми выбранными в зависимости от целей и задач исследования, методами окрашивания.



ГЛАВА 16

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитология – это наука, изучающая строение, химию и физиологию клеток. Основными ее разделами являются цитохимия и цитофизиология. Цитохимия исследует химический состав клетки, локализацию и динамику превращений в ней химических веществ. Цитофизиология изучает морфологию физиологических изменений в клетках. Решая эти задачи, цитологические исследования предполагают использование инструментальных и биохимических методов прямого наблюдения за живыми клетками и тканями, а также методов непрямого анализа (схема 5).

В основу *клинической* цитологии положено изучение и оценка клеточного материала, полученного различными способами из патологического очага. Наряду с традиционной клинической цитологией, изучающей жидкости (экссудаты, промывные воды), выделения (моча, мокрота), мазки с поверхностей органов или опухолевидных образований, в настоящее время интенсивно развивается пункционная цитология. Материал при этом получают пункцией тонкой иглой исследуемых органов под контролем рентгенологического, ультразвукового или томографического исследования.

Ведущим диагностическим направлением клинической цитологии является онкоцитология. При распознавании онкологических заболеваний на ранних стадиях цитологический метод имеет несомненные преимущества перед другими методами исследования.

Современные методы цитологических исследований



Материал для цитологического исследования (моча, содержимое кист, промывные воды, мокрота) доставляются в лабораторию в возможно короткие сроки. Высушенные на воздухе мазки можно некоторое время хранить (лучше не более 6 часов).

Цитологические материалы сопровождаются направлением, в котором указываются предполагаемый диагноз, краткий анамнез болезни с указанием предшествующего лечения, по возможности результаты других исследований. Необходимо четко указывать, каким образом и откуда получен материал, в каком виде (кусочек, жидкость, мазок) и количестве он направляется на исследование.

Если материал получен в виде жидкости, из нее готовят мазок. При достаточном объеме доставленной жидкости ее можно предварительно центрифугировать, а мазки готовить из осадка. При осмотре или в ходе оперативного вмешательства можно делать мазки-отпечатки со слизистых оболочек, кожи, поверхности биоптата или удаленного оперативно участка органа. Нередко лучшего качества получаются мазки-отпечатки с участков, из которых идут выделения, чем из самих выделений (сосок молочной железы, выходное отверстие свища). Если необходимо сделать мазок-отпечаток с кровоточащей поверхности, то кровь предварительно промокают фильтровальной бумагой, а затем быстро готовят мазок.

16.1. Приготовление мазков (крови, лимфы, красного костного мозга, взвеси органов и тканей)

Ход методики

1. Чистые, сухие и обезжиренные в смеси Никифорова предметные стекла маркируют.

2. Наносят небольшую каплю (0,1-0,3 мл) крови или клеточной суспензии и с помощью шлифовального стекла делают мазок, который должен быть равномерным и тонким. Для этого шлифовальное стекло ставят слева от капли под углом 45°, ждут, пока жидкость не растечется вдоль его ребра, и быстрым легким движением проводят его вперед, не отрывая от предметного стекла раньше, чем иссякнет капля.

3. Для получения мазков из костного мозга на предметное стекло помещают небольшой фрагмент кроветворной ткани

(1x1мм³), добавляют 0,1-0,3 мл сыворотки и готовят препарат так же как в п.1.

4. Мазки высушивают и фиксируют в смеси Никифорова 30-40 минут, или в метаноле 3-5 минут.

5. Окрашивают мазки необходимым способом.

16.2. Приготовление мазков-отпечатков

Ход методики

1. Органы, ткани разрезают бритвой на фрагменты, помещают на чистое, сухое обезжиренное стекло и, слегка придавливая пинцетом, делают 15-20 отпечатков.

2. Препарат высушивают, фиксируют в метаноле или жидкости Никифорова, окрашивают.

16.3. Приготовление цитологических препаратов путем заключения под покровное стекло

Ход методики

1. Клеточную суспензию в объеме 100-200 мкл или фрагмент ткани 0,5 x 0,5мм³ наносят на сухое, чистое, обезжиренное в жидкости Никифорова стекло и накрывают покровным стеклом.

2. Под стеклом не должны оставаться пузырьки воздуха. Избытки жидкости убирают фильтровальной бумагой.

3. Для предохранения высыхания препарата, при длительном исследовании, края покровного стекла герметизируют парафином или вазелином.

4. Препарат изучают методом фазово-контрастной микроскопии. Если материал был предварительно окрашен витальными красителями или флуоресцентными красителями, то приготовленные препараты изучают с использованием световых или люминесцентных микроскопов.

16.4. Приготовление цитологических препаратов с помощью цитоцентрифуги

Ход методики

1. Суспензию клеток, взвесь гемопоэтических клеток, колоний наносят на чистое, сухое, обезжиренное в жидкости Никифорова предметное стекло.

2. Подготовленные стекла помещают в рабочую камеру цитоцентрифуги (РС-6, ОПН-3,4 или «Вескман»).

3. Центрифугируют при 1000-1200 об/мин 3-10 мин при 6-10°C.

4. Препараты высушивают, фиксируют, окрашивают.

Современные эндоскопические устройства снабжены насадками, позволяющими получать материал для цито- и гистологического исследования. В зависимости от задач исследования, используя эндоскопические приборы, можно готовить мазки тампоном, мазки щеточкой, мазки-отпечатки, щипковые биопсии, мазки промывных вод.

Независимо от метода изготовления, мазки высушивают на воздухе, затем фиксируют. Чаще всего в качестве фиксатора используют 100% этанол (15-30 минут), метанол (3-10 минут) или смесь Никифорова (от 15 минут до 2 часов).

16.5. Окраска цитологических препаратов по Гимзе

Приготовление красящего раствора

Смешивают 3,772 г азура I, 2,165 г эозина, 1,563 г метиленового синего, 750 мл метилового спирта, 256 мл глицерина. Перед использованием разбавляют водой в соотношении 1:4 (рН около 7).

Методика окраски

Фиксированный в течение 3 минут в метаноле препарат окрашивают 30 минут, ополаскивают водой, подсушивают на воздухе.

16.6. Окраска по Романовскому – Гимзе

Для приготовления рабочего раствора продажную форму красителя Романовского-Гимзе разводят в соотношении 1:4 дистиллированной водой. Лучше использовать только свежеприготовленный рабочий раствор.

Сухие, фиксированные в метиловом спирте или жидкости Никифорова препараты, окрашивают 5-7 минут, тщательно промывают. При необходимости дифференцируют подкисленной уксусной кислотой водой и высушивают.

16.7. Окраска по Паппенгейму

Метод не требует предварительной фиксации.

Приготовление красящих растворов

Краска - фиксатор Май-Грюнвальда готовится растворением 250 мг порошка краски Май-Грюнвальда в 100 мл метанола. Смесь нагревают на водяной бане при 70°C до полного растворения краски, затем фильтруют. Краситель Романовского-Гимзы готовится разведением дистиллированной водой в соотношении 1:4.

Методика окраски

1. Высушенные мазки устанавливают горизонтально. Наливают на них краситель Май-Грюнвальда на 3 минуты.
2. Не сливая краску, разбавляют ее на стекле в 2 раза, оставляют на 1 минуту.
3. Не ополаскивая мазки, окрашивают их красителем Романовского-Гимзы – 5 минут.
4. Промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

16.8. Окраска по Лейшману

Приготовление красящих растворов

1. 2,5 г сухой краски Лейшмана растворяют в 1 л метилового спирта. Краситель дозревает 4 суток.
2. Азур: 1 г азура II растворяют в 1л дистиллированной воды в течение 3-4 недель.
3. Эозин: 1 г эозина растворяют в 1 л дистиллированной воды. Выдерживают 3-4 недели.

Методика окраски

1. Высушенные нефиксированные препараты окрашивают красителем I – 1-3 минуты.
2. Промывают водопроводной водой.
3. Окрашивают приготовленным перед использованием красителем, содержащим азур, эозин, дистиллированную воду в соотношении 4:3:7 – в течение 30 минут.
4. Промывают водопроводной водой, высушивают.

16.9. Быстрый метод окраски по Алексееву

1. Мазки фиксируют и окрашивают подогретым до 40°C красителем Мая-Грюнвальда (см. выше) – 30 секунд.
2. Промывают водой.
3. Окрашивают раствором азур-эозина (2:1) – 2 минуты.
4. Ополаскивают водой.
5. Высушивают, промокая фильтровальной бумагой.

16.10. Окрашивание цитологических препаратов гематоксилин-эозином

Приготовление красящего раствора гематоксилина

5 г алюмокалиевых квасцов растворяют в 50 мл дистиллированной воды, доводят до кипения, затем добавляют 0,1 г гематоксилина. Разводят 50 мл дистиллированной воды и повторно доводят до кипения. В остывший раствор добавляют иодат ка-

лия. Краситель созревает на свету при доступе воздуха около 5 недель.

Методика окраски

1. Препарат фиксируют 96% спиртом – 5-10 минут.
2. Окрашивают гематоксилином – 5 минут.
3. Промывают проточной водой.
4. Окрашивают 0,3% спиртовым раствором эозина – 1 минуту.
5. Промывают проточной водой, высушивают.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ



17.1. Общие принципы культивирования

Метод культуры тканей – это клиничко-экспериментальная методика, в которой группа клеток в стерильных условиях извлекается из организма и переносится в естественную или искусственную питательную среду. При благоприятных условиях клетки могут сохраняться длительное время.

С помощью культуральных технологий в настоящее время проводятся:

- исследования фундаментальных закономерностей функционирования клеток, тканей, органов;
- разработка новых подходов в лечении многочисленных заболеваний человека;
- манипуляции со стволовыми и репродуктивными клетками человека;
- создание клеток с измененным геномом;
- конструирование новых материалов, искусственных органов и систем;
- сохранение многообразия клеток и клеточных линий;
- оценка эффективности и производство лекарственных препаратов, биоактивных веществ, биодобавок, диагностических средств;
- проверка безопасности новых веществ, материалов, препаратов, экологических и производственных факторов.

Рост клеток в культуре обычно протекает в виде ряда фаз. Начальная фаза, получившая название «лаг-период», характери-

зуются низкой функциональной активностью клеток, которые в это время начинают адаптироваться к новым условиям обитания. Обычно он длится от нескольких часов до 1-2 суток, после чего клетки вступают в фазу логарифмического роста. Как правило, во втором периоде наблюдается увеличение количества клеток за счет процессов пролиферации. Увеличение клеточной массы в это время может не сопровождаться делением клеток, а происходить за счет разрастания и гипертрофии исходной ткани. У различных типов клеток с учетом их функционального состояния темп и скорость развития фазы логарифмического роста может значительно варьировать.

Скорость воспроизведения обусловлена и технологическими причинами и степенью дифференцировки исходного клеточного материала. Чем менее дифференцированные клетки используются в культуре, тем быстрее они пролиферируют. Низкий уровень специализации и наличие большого количества делящихся клеток-предшественников обеспечивает активный рост и лучшую выживаемость культур, полученных из эмбриональных тканей и органов по сравнению с их «взрослыми» аналогами. Взрослые ткани характеризуются высоким содержанием специализированных, дифференцированных неделящихся клеток, поэтому культивирование и размножение клеток «взрослых» тканей затруднено. Продолжительность жизни таких культур обычно невелика.

Культивирование сопряжено с постоянным увеличением количества клеток, причем условия культивирования направлены на обеспечение максимальной скорости их деления. К таким условиям относятся: присутствие факторов роста, невысокая концентрация Ca^{2+} , небольшая плотность клеток в субстрате.

Напротив, высокая плотность клеток и концентрация Ca^{2+} , отсутствие факторов роста и присутствие факторов дифференцировки ведут к снижению скорости пролиферации и усилению дифференцировки клеток.

Нормальные клетки органов и тканей при любом уровне дифференцировки дают начало культурам с ограниченной продолжительностью жизни. Культуры клеток, полученные из опу-

холей, способны пролиферировать неограниченно долго, даже если клетки таких культур достигают определенной степени дифференцировки.

Органные культуры (фрагменты тканей или органов) сохраняют некоторое время межклеточную архитектуру, исходный уровень дифференцировки, не растут и сохраняют равновесное состояние.

Культуры диспергированных клеток изначально лишены структурно-функциональной межклеточной организации, при создании благоприятных условий активно пролиферируют, не достигая равновесного состояния. Это позволяет в короткие сроки получать большое количество клеток и разделять их в последующем на фенотипические или генотипические разновидности.

Во время логарифмического роста для измерения жизнеспособности клеток наиболее часто используют методы оценки их метаболической активности. В частности, определяют уровень кислорода, углекислого газа, содержание глюкозы, молочной и пировиноградной кислот. При этом наблюдается тесная корреляция между всеми вышеперечисленными параметрами. Однако, в фазы стабилизации или дегенерации, изменение метаболической активности может быть связано не с ростом клеток, а состоянием их функциональной активности, что может привести к получению артефактов. В этом случае целесообразно использовать прямые методы, основанные на измерении потенциала клеток, биохимических параметров, эмпиансометрии и изучении их клоногенной активности.

После завершения активной фазы роста культура переходит в стационарное состояние, когда количество образовавшихся и погибших клеток находятся в динамическом равновесии. Затем, по мере старения клеток, истощения питательной среды, изменения рН, происходит постепенная дегенерация клеток в культуре. Их количество снижается, процессы инволюции системы преобладают над способностью к самообновлению. Обычно соматические клетки, вследствие наличия теломеразы способны к ограниченному числу делений, которое не превышает 40-60 циклов.

При исследовании клеточных культур может наблюдаться ряд артефактов, затрудняющих работу и интерпретацию полученных результатов. Наиболее частые причины и способы их устранения показаны в таблице.

**Основные трудности, возникающие при проведении культуральных работ и способы их устранения
(В.П.Шахов с соавт., 2004)**

Причины	Возможные пути их устранения
Клетки лизируются и погибают вскоре после их помещения в культуру	<p>Нарушение осмолярности или pH среды. Проверить осмолярность и pH, приготовить новые растворы и среды (приложения 3 -9).</p> <p>Среды (добавки, сыворотка) токсичны. Провести цитологический тест на всю среду и отдельные ее компоненты, включая антибиотики и сульфаниламиды. Выявленные токсические продукты заменить.</p> <p>Грязная посуда. Использовать одноразовую посуду. Усилить контроль за обработкой многоразовой посуды. Не допускать попадания в культуру остатков детергента и других загрязнений.</p> <p>При стерилизации жидкости фильтрованием или культивировании клеток на полупроницаемых мембранах в культуру могут попадать токсичные для клеток пропитки фильтров. Их удаляют путем 3-4 кратного кипячения мембран в больших объемах бидистиллированной воды.</p> <p>В воздухе лаборатории могут оставаться следы летучих токсичных веществ, которые могут адсорбироваться средой. Тщательно проветрить помещение.</p>
Большое количество нежизнеспособных и разрушенных клеток, полученных сразу после выделения и очистки кариоцитов	<p>Методы выделения и сепарации клеток травматичны. В частности, при механической или ферментативной обработке могут нарушаться структурно-функциональные свойства. Использовать более щадящую технику выделения и обработки клеток. Строго соблюдать температурный режим.</p>

Развитие культуры не происходит	Неправильный подбор сред, ростовых факторов, добавок, гормонов. Просроченные или некачественные среды, сыворотка. Нарушение газовой среды, влажности или температуры культивирования. Грязная посуда. Проверить условия культивирования, качество ростовых факторов, сред, сывороток и, при необходимости, заменить их (приложения 3 -9).
Неясные причины по-прежнему остаются	Провести контрольные исследования в другой культуральной лаборатории

Для культивирования клеток обычно используют пластмассовую посуду одноразового применения или стеклянные емкости. Пластмассовая посуда обычно оптически прозрачна, подготовлена для культивирования модификацией пластмассы, увеличивающей смачиваемость поверхности и облегчающей прикрепление клеток. Такая посуда поступает в продажу стерильной, в герметичной упаковке. Основным недостатком ее является высокая стоимость.

Стеклянная посуда может быть использована многократно. После каждого применения ее моют, выдерживают в растворе нетоксичного детергента, тщательно промывают проточной, а затем деионизированной водой (приложение 1). После высушивания стеклянную посуду стерилизуют, лучше в сухожаровом шкафу, при температуре 160°C в течение 1 часа.

При выборе посуды руководствуются предполагаемым объемом культивируемых клеток (максимальная плотность клеток в культуре $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ клеток в см^3). При большем количестве параллелей и одновременном отборе образцов удобно пользоваться многолуночными пластинками Тераски или микротитровальными пластинками. При отборе образцов в разное время предпочтительнее пользоваться индивидуальными флаконами, чашками или бутылками.

В некоторых случаях поверхность посуды дополнительно покрывают коллагеном, желатином или полилизинном, что придает ей положительный заряд и облегчает прикрепление культивируемых клеток.

17.2. Культуральные среды

Среду культивирования и газовую фазу выбирают, как правило, опытным путем в зависимости от задач исследования и возможностей лаборатории.

Среды, используемые для культивирования (приложения 6 – 9), разделяют:

по способу приготовления – на искусственные или синтетические (Игла, Хэмса, 199) и естественные (сыворотки, плазма, экстракты);

по назначению – препаративные (для выделения, промывки клеток), поддерживающие (обеспечивающие нормальную жизнедеятельность непролиферирующих соматических клеток), ростовые (содержащие ростовые факторы, обеспечивающие процессы пролиферации и дифференцировки клеток), специальные (для специальных методов исследования, например, криоконсервации или выращивания специализированных клеток);

по консистенции – жидкие (199, Игла), вязкие (метилцеллюлоза), полутвердые (агар, агароза, коллаген, плазма), твердые (коллагеновый матрикс, агар);

по содержанию сыворотки – сывороточные, с низким содержанием сыворотки (менее 1%) и бессывороточные;

по форме изготовления – сухие, жидкие, концентрированные.

По функциональным характеристикам культуральные среды подразделяются следующим образом:

1. Среды для постоянных линий клеток с небольшими добавками сыворотки или белков: D-MEM, α -MEM, McCoу-5A.

2. Среды для постоянных линий клеток с добавлением очищенных белков или гормонов: F-10, F-12, DI-MEM, MCDB-110.

3. Среды для постоянных линий клеток в монослое без добавления белков: CMRL-1066, MCDB-411.

4. Среды для клонального роста постоянных линий клеток без добавления белков: F-12, MCDB-301, 302, 153-210.

5. Среды для нетрансформированных клеток: D-MEM, DI-MEM, 105, 401, 501.

6. Специальные средовые системы для выращивания стволовых, кроветворных, мышечных, эндотелиальных или других специализированных клеток.

Несмотря на то, что многие среды являются «универсальными» и пригодны для многих методик, тем не менее, в зависимости от специфичности сыворотки, предпочтительно использовать:

1. Для клеток обезьяны и человека: 199, McCOY 5A, RPMI-1640, MCDB-202.

2. Для клеток кролика и крысы: F-12, MCDB-104.

3. Для нетрансформированных клеток мыши: D-MEM, MCDB-202, MCDB-401.

4. Для куриных клеток: 199, D-MEM, F-12K.

5. Для эмбриональных тканей: M2, M16.

Некоторые рекомендуемые среды приведены в приложении 10.

Синтетические среды включают в свой состав воду, сбалансированные солевые растворы, буферные системы, аминокислоты, ростовые факторы, гормоны и другие вещества (приложения 2-9).

Сбалансированные солевые растворы являются основным компонентом всех синтетических сред и предназначены для поддержания постоянства осмотического давления, pH среды, снабжения клеток необходимыми ионами. Солевые растворы используются в качестве препаративных сред, предназначенных для отмывки, очистки и выделения клеточного материала. Качественный и количественный состав компонентов, входящих в основные сбалансированные солевые растворы представлен в приложении 2.

Сбалансированные солевые растворы выпускаются предприятиями России и зарубежными фирмами. В лабораторных условиях можно самостоятельно изготовить сбалансированные солевые растворы. Для этого используют высокоочищенную воду (приложение 1) и соли. Сначала растворяют все добавки, за

исключением солей магния и кальция, которые добавляют в раствор в последнюю очередь. Размешивают, с помощью магнитной мешалки, при 20-30°C. Полученные растворы стерилизуют фильтрованием, кипячением и автоклавированием. Хранят при 4°C неограниченно долго. Контроль pH среды осуществляют с помощью индикатора фенолового красного, который добавляют в раствор в дозе 5-10 мг/л (при pH 7,2 краситель имеет красновато-оранжевый цвет), или с помощью pH-метра.

Буферные системы (приложения 3-5), применяемые в культуральных исследованиях, как правило, входят в состав сбалансированных солевых растворов. Кроме того, буферные системы могут использоваться самостоятельно для отмывки клеток или проведения различных иммунологических, цитохимических и биохимических реакций.

0,1M фосфатный буфер (pH 5,7-8,0)

Раствор А готовят путем смешивания 27,58 г NaH_2PO_4 или 19,078 г KH_2PO_4 с 1000 мл бидистиллированной воды. Раствор Б получают при добавлении 28,38 г Na_2HPO_4 (35,92 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 1000 мл бидистиллированной воды. Рабочий раствор готовят путем смешивания растворов А и Б в соответствии с пропорциями (приложение 3) и доведением объема до 200 мл бидистиллированной водой. Растворы А и Б хранятся отдельно при 4°C неограниченно долго.

0,05M трис-HCl буфер (pH 7,19 - 9,1) (Гомори)

Основной раствор трис-HCl готовят путем добавления к 24,2 г триоксиметиламинометана 1000 мл бидистиллированной воды. Буфер заданного pH получают путем смешивания 25 мл основного раствора с 0,1N HCl и доведением общего объема водой до 100 мл. Приготовление трис-HCl буферных систем с различным pH представлено в приложении 4. Другие буферные системы применяются значительно реже (приложение 5).

При работе со средами следует придерживаться некоторых правил.

1. Перед началом работы с клетками необходимо выбрать среду, соответствующую данному типу клеток и условиям предстоящего культивирования.

2. Среда, поступающие в лабораторию, могут быть некондиционными в силу разнообразных причин (нарушения условий транспортировки, хранения, использования некачественного сырья). Для избежания ошибок всегда необходимо осуществлять предварительное тестирование среды на уровень осмотического, онкотического давления, pH и цитотоксичность. Самым простым скрининговым методом, позволяющим интегрально судить о биологической совместимости той или иной среды, служит совместная кратковременная инкубация среды (9 частей) с отмытой взвесью эритроцитов (1 часть эритроцитов человека или лабораторных животных, в концентрации 10млн в 1 мл). Если после 10-15 мин инкубации при 37°C изменяется форма, размеры или наступает лизис эритроцитов, то среда непригодна для использования в дальнейшей работе.

3. Перед употреблением среду лучше разогреть до 37°C. При использовании клеток, выделенных из культур, лучший рост наблюдается, когда забор материала осуществляется в логарифмическую фазу роста.

4. Обычно оптимальное количество культивируемых клеток варьирует в пределах 0,05-0,5 млн/мл или 5-50 тысяч на квадратном сантиметре.

5. Любая культуральная среда способна поддерживать рост клеток в строго ограниченный период времени, зависящий от плотности посева, пространственной организации культуры, скорости утилизации питательных веществ, ростовых факторов, поступления кислорода, редокс-потенциала, уровня углекислого газа, накопления токсичных продуктов и ингибинов.

В связи с этим, необходимо для каждого конкретного исследования определять способность определенного объема среды поддерживать в течение конкретного периода времени адекватную жизнеспособность определенного количества клеток и, с

учетом полученных данных, осуществлять замену истощившейся культуральной среды.

Основные типы сред и дополнительных компонентов, используемых для культивирования клеток, представлены в приложении 6 -10.

17.3. Факторы адгезии клеток

Для успешного культивирования, поддержания процессов пролиферации и морфогенеза большинство клеток и клеточных линий требуют предварительного прикрепления к твердому субстрату. При этом создаются необходимые условия, определяющие свойства растущих клеток. Традиционным субстратом для культивирования клеток является стекло, пластик, нитрозоацетатные полупроницаемые мембраны, реже – металлы, ситаллы или керамика.

Большинство клеток животного происхождения обладает способностью прилипнуть к поверхности стекла или пластика за счет электростатических сил. Обычно этот процесс осуществляется с участием вспомогательных молекул адгезии, находящихся в питательной среде и адсорбируемых к этим поверхностям. Как правило, такие матриксные молекулы поливалентны и способны образовывать мостики между стеклом, пластиком и клетками. Такие факторы присутствуют в сыворотке крови, экстрактах, продуцируются клетками или являются компонентами экстрацеллюлярного матрикса.

Основными молекулами экстрацеллюлярного матрикса, известными к настоящему времени, являются коллаген, фибронектин, ламинин, витронектин, протеогликаны, гликозаминогликаны и их производные.

В качестве иллюстрации ниже приводим прописи использования некоторых факторов адгезии.

17.3.1. Обработка посуды для культивирования коллагеном

Коллаген используется для прикрепления и выращивания мышечных клеток, гепатоцитов, эмбриональных легочных клеток, эпителиальных клеток.

Методика обработки

1. Растворить лиофилизированный коллаген в 0,1 М растворе уксусной кислоты до концентрации 2 мг/мл.
2. Перенести в чистую культуральную посуду из расчета 5-10 мкг/ квадратный см. Смочить рабочую поверхность путем покачивания.
3. Высушить при комнатной температуре в течение 45–60 минут.
4. Промыть посуду сбалансированным фосфатным буфером.
5. Удалить надосадочную жидкость и внести культивируемые клетки.

17.3.2. Обработка культуральной посуды поли-L-лизинем

Прикрепляющее действие полилизинов осуществляется за счет электростатического взаимодействия между отрицательным зарядом клеточной мембраны и положительным зарядом полимера. Кроме того, полилизинны после прикрепления клеток обладают эффекторным действием на пролиферативную и функциональную активность клеток.

Методика обработки

1. Растворить 5 мг поли-L-лизина в 50 мл воды реagentного качества.
2. В асептических условиях покрыть поверхность культуральной посуды из расчета 0,1 мг/мл для покрытия 25 квадратных сантиметров посуды путем покачивания.

3. Через 5-7 минут удалить избыток надосадочной жидкости.

4. Добавить 100 мкл стерильной воды на 1 кв.см и тщательно промыть поверхность. Необходимо полностью удалить остатки поли-L-лизина, так как они способны ингибировать пролиферацию клеток.

5. Использовать посуду немедленно. Допускается использование подготовленной посуды в течение 2 часов после обработки при условии ее хранения на льду.

17.4. Выделение клеток из органов и тканей

В органах, тканях, культурах, клетки взаимодействуют друг с другом и структурами межклеточного вещества. Культивирование нередко требует разрушения таких связей. Для этого используют механическую, ферментативную обработку или обработку тканей хелатирующими агентами. Основные требования при выделении материала заключаются в соблюдении правил асептики и антисептики, минимальной травматизации клеток, унификации, стандартизации методов получения и обработки тканей.

Механическая диссоциация тканей является травматичной, разрушает большое количество клеток. В оставшихся клетках, в результате повреждения мембранных структур, могут изменяться процессы дифференцировки, пролиферации, функциональная активность. Вместе с тем, такие методы просты в исполнении, не требуют значительных затрат и дополнительного химического воздействия на клетки. Для предупреждения излишней травматизации при механической диссоциации манипуляции проводятся при пониженных температурах (0 - 4°C) с использованием силиконизированных инструментов и посуды, с добавлением сыворотки или бычьего сывороточного альбумина. Разработаны методы механической диссоциации пипетированием, гидродинамическим воздействием с использованием шприца с длинной иглой, с использованием гомогенизаторов, путем соскабливания.

Ферментативная обработка тканей и клеток является более щадящей, по сравнению с механической диссоциацией. В этих целях используют протеолитические ферменты: трипсин, коллагеназу, эластазу, протеазу. Недостатками метода является то, что ряд ферментов способен повреждать рецепторный аппарат клеток, и, в этой связи, менять их функциональную активность. Кроме того, при ферментативной обработке могут образовываться побочные продукты (муциновый и нуклеиновый сгустки), затрудняющие дальнейшие операции с клетками.

Обработку тканей и клеток хелатирующими агентами используют при работе с культурами, в которых адгезия структур определяется кальций зависимыми механизмами. Связывание двухвалентных ионов кальция при этом методе производится хелатирующими агентами. К таковым относят этилендиамин тетрауксусную кислоту, трилон В. Обработку хелатирующими агентами нередко сочетают с обработкой ферментами.

17.5. Методики культивирования

Жизнеспособность культур обусловлена правильным подбором и реализацией условий существования (субстрат, среда, газовая фаза, температурный режим), своевременным предотвращением микробного заражения - использованием антибиотиков, ламинарных боксов, постоянным мониторингом pH и визуальным контролем культуры. Методики культивирования отдельных клеток или тканей имеют особенности, связанные и с органной принадлежностью материала, и с целями и задачами, стоящими перед исследователем. В этой связи, в каждой лаборатории культуры клеток, на основе базовых, разрабатываются собственные методики культивирования. В данном пособии, не претендующем на полноту изложения проблемы, в качестве иллюстрации сложности методик культивирования предлагаем методики, описанные В.П. Шаховым с соавторами.

17.5.1. Получение монослойной культуры фибробластов

Монослойные культуры фибробластов используют в качестве фридерного слоя для выращивания кератиноцитов, миелоцитов, миоцитов и других типов клеток. Фибробласты, выделенные из эмбриональной ткани, применяют для формирования фридера в двуслойных системах при культивировании стволовых клеток. Для получения монослойных культур фибробластов, как правило, используют ткани, содержащие большое количество механоцитов или клеточные линии.

Методика культивирования

1. Обработать участок кожи, очищенный от волос, 70% этанолом. Острым режущим инструментом выделить блок, объемом 1мм³.

2. Перенести в 35 мм чашку Петри, промыть охлажденным сбалансированным солевым раствором. Для улучшения прикрепления и роста фибробластов дно чашек целесообразно дополнительно обрабатывать факторами адгезии – коллаген, желатин, полилизин (см. выше).

3. Фрагменты кожи с помощью ножниц измельчить на 6-12 кусочков. Раствор удалить и заменить полной средой, содержащей 90% среды DI-MEM с низким содержанием глюкозы, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 250 мг/л глутамина, 10⁻⁶М дексаметазона, 50 мг/л гентамицина. Кусочек кожи должен быть обращен эпидермисом наружу. На каждый кусочек наносится по 1-2 капли среды. В одной чашке должно находиться не более 5-6 фрагментов кожи. Если фрагменты будут большими, то может происходить их закручивание.

4. Инкубируют при 37°C, 100% влажности и 5% CO₂.

5. Через 12-18 часов в культуру доливают 3-4 мл полной питательной среды так, чтобы частицы кожи не оторвались от дна чашки.

6. Материал культивируют при 37°C, 100% влажности и 5% CO₂ в течение 14-30 суток до образования монослоя клеток.

7. Культуру исследуют методом количественной компьютерной морфометрии, после чего с помощью растворов проназы, ЭДТА или трипсина снимают с поверхности клетки для цитологического, цитогенетического или других исследований.

При проведении экспериментов следует учитывать, что при выращивании фрагментов кожи, наряду с фибробластами, в культуре могут определяться макрофаги, лимфоциты, тучные, эпителиальные и другие клетки.

17.5.2. Культивирование стволовых клеток эмбриона крысы

Данная методика предназначена для изучения механизмов дифференцировки стволовых клеток. В некоторых случаях стволовые клетки получают из эмбриональных клеточных линий, тератом, плаценты, опухолевых клеток или осуществляют пересев ядра в подготовленную яйцеклетку для последующего клонирования.

Методика культивирования

1. Выделяют несколько 8–16-клеточных эмбрионов из матки беременной крысы (или используют другие источники стволовых клеток).

2. Помещают в каплю сбалансированного фосфатного буфера Дульбекко без ионов кальция и магния.

3. С помощью пипетки разбивают эмбрионы на отдельные клетки.

4. Осторожно объединяют материал от нескольких эмбрионов, центрифугируют в силиконизированных пробирках при 1500 об/мин в течение 15–20 минут.

5. Надосадочную жидкость замещают полной питательной средой следующего состава: 80% DI-MEM или NCTC-135, 19% ЭТС, 200мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1% бычьего сывороточного альбумина, 2 нг/мл интерлейкина-6, 5 нг/мл фактора роста стволовых клеток, 1 нг/мл лейкоингибирующего фактора, 0,2 мкг/мл селенита натрия, 25 мкг/мл трансферрина.

6. Клетки переносят в 96 луночные плоскодонные чашки предварительно покрытые фридерным слоем. Фридерный слой готовят из стромальных эмбриональных клеток 3–7-суточных крысят (1–3-кратного пассажа) той же линии, культивированные в течение 7–14 суток. Первоначальная плотность посева $1-5 \times 10^6$ /мл при 37°C , 100% влажности и 5% CO_2 . После образования монослоя фридерный слой облучают в дозе 5–10 Гр.

7. Стволовые клетки культивируют в течение 3–4 суток до образования агрегатов, содержащих 8–16 клеток, после чего их собирают, разбивают на отдельные клетки пипетированием и переносят в новые чашки с фридерным слоем.

8. Культивируют в течение 2–3 недель с заменой каждые 3–4 суток 50% полной питательной среды на свежую при $34-37^\circ\text{C}$, 100% влажности и 5% CO_2 .



ГЛАВА 18

ИССЛЕДОВАНИЕ БИПСИЙНОГО И ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

Особенностью современного этапа развития клинической морфологии является широкое внедрение гистологических методов исследования для прижизненной диагностики различных заболеваний. Целью таких исследований является не только уточнение клинического диагноза и установление его в неясных случаях, но и определение эффективности проводимого лечения, решение вопроса о необходимости и объеме оперативного вмешательства.

Многолетняя клиническая и патологоанатомическая практика показала, что пунктат диаметром 1 мм или биоптат диаметром 2 мм могут служить полноценным источником диагностической информации.

Вместе с тем существует определенный пороговый объем биоптата, за пределами которого вероятность правильной диагностики резко снижается. Например, гастробиоптаты должны содержать в себе все пластинки слизистой оболочки и часть собственной пластинки, содержащую шеечные части желез, выявит повышенный митотический индекс, что может отразиться на дальнейшей постановке диагноза, если не иметь в виду, что шеечная часть желез является основной зоной регенерации эпителиальных структур слизистой оболочки желудка.

При диагностике патологических процессов в почке желательно иметь образец, включающий корковое вещество и наружную часть мозгового. При этом корковое вещество должно содержать около 25 почечных телец, хотя о природе патологи-

ческого процесса можно судить и по 5 клубочкам, рассеченным в центральной части.

В зависимости от способа забора материала различают открытую, пункционную, аспирационную, эндоскопическую биопсию, трепанобиопсию.

При любом способе забора полученный материал фиксируют незамедлительно в достаточном объеме 10% формалина, помещают в отдельную промаркированную емкость. Кроме того, в емкость помещают маркированную бирку, изготовленную из плотной непромокающей бумаги. Надписи делают мягким простым карандашом. Забранный материал сопровождается стандартными направлениями. В нем указываются характер патологического процесса, его локализация, анамнез болезни, основные методы проведенного ранее лечения.

При поступлении в патоморфологическую лабораторию материалу присваивается индивидуальный порядковый номер, которым маркируются в последующем все рабочие материалы. Необходимо указывать время поступления материала и характер биопсии – диагностическая, операционный материал. Развитие методов гистологической техники при обработке биопсийного материала направлено на максимальное уменьшение продолжительности изготовления препаратов, что обеспечивает быстрое и точное установление диагноза.

Во многом этому способствует автоматизация обработки тканей. Хорошо зарекомендовали себя карусельные аппараты для обезвоживания ткани и подготовки ее к заливке – АТ-4, АТ-5, АТ-4М. Они действуют по принципу переноса образцов из одного стакана в другой. Аппараты нового поколения основаны на том, что кусочки ткани находятся в герметичной камере, в которую последовательно по заданной программе подаются реагенты из специальных, предварительно заполненных резервуаров. Такие аппараты позволяют менять давление, создаваемое в камере, температурный режим, что значительно уменьшает время обработки и повышает количество получаемых в последующем срезов. Примером аппаратов такого принципа действия являются “Hypercenter XP” (Великобритания). Их использование позволяет

обрабатывать материал эндоскопических и пункционных биопсий за несколько часов. Цикл обработки крупных кусочков – 16-18 часов. Сокращать продолжительность подготовки материала к микроскопии позволяет и использование микротомов, модернизированных специальными зажимами для блоков, устройствами для переноса срезов с ножа на наклонный термостатированный поток жидкости.

Монтированные на стекла препараты окрашивают в многопрограммных автоматах. Так, например, автомат “Varistain XN” (Великобритания) имеет вытяжку, закрытый контур, окрашивает одновременно 66 препаратов по любой из 20 программ окраски. В отсутствие автоматизированных приборов и устройств обработку материала ведут традиционным способом по ускоренным методикам, специфичным для каждого органа и ткани.

Общие требования к забору и консервации материала, правила оформления направления, доставка (практические рекомендации)

Направление на морфологическое исследование

(типсовая учетная форма медицинской документации 014/у, модифицированная в соответствии со спецификой медицинского учреждения) является основным учетным документом (приложение 13).

Лицевая часть заполняется врачом, производившим инвазивную манипуляцию. Обязательно заполнение всех предусмотренных в бланке направления граф:

- фамилия, имя, отчество пациента;
- дата рождения пациента;
- пол пациента;
- данные полиса обязательного медицинского страхования (наименование страховой компании, серия и номер полиса);
- наименование направившего учреждения или подразделения;
- номер кабинета, в котором производилась инвазивная манипуляция;

- номер протокола;
- дата взятия материала;
- вид инвазивного исследования;
- краткая характеристика объекта (объектов) исследования (описание эндоскопической, ультразвуковой, рентгеноскопической картин патологического процесса);
- сведения о маркировке материала и количестве объектов исследования;
- сведения о предыдущих биопсийных исследованиях;
- клинический диагноз (заключение);
- срочность исследования.

Направление подписывается врачом, производившим биопсию и медицинской сестрой. Фамилию и инициалы врача и медицинской сестры указывать обязательно. При направлении материала из сторонних организаций необходимо также указывать наименование отделения (лаборатории) и служебный телефон. Врач несет ответственность за правильность заполнения направления и полноту указанных в нем сведений. Медицинская сестра несет ответственность за качество фиксации, соответствующие маркировки объектов исследования данным, указанным в направлении и своевременность доставки материала.

Вид исследования

Вид исследования определяется в соответствии с приведенным ниже перечнем:

- эндоскопическая щипковая биопсия;
- эндоскопическая пункционная биопсия;
- эндоскопическая браш-биопсия;
- пункционная биопсия мануальная;
- пункционная биопсия под контролем УЗИ (КТ);
- операционная биопсия; соскоб;
- мазок;
- мазок-отпечаток;
- биологическая жидкость (секреты, отделяемое);
- промывные воды;
- экссудат (транссудат).

Объем исследования определяется врачом в каждом случае индивидуально, с учетом общих рекомендаций (приложение 12).

Характеристика патологического процесса

Описание объекта исследования формулируется по возможности кратко. Вместе с тем, из него должно быть ясно:

- топография процесса с точным указанием *органа, его части, зоны, области, ткани*;

- общая макроскопическая оценка характера патологического процесса, с использованием устойчивых терминологических характеристик (полип, язва, рубец, узел, утолщение стенки и др.);

- характеристика качественных признаков патологического процесса (размеры, форма, характер контуров, поверхности, цвет, консистенция, состояние окружающих тканей и синтопические взаимоотношения описываемого процесса с близлежащим анатомическими образованиями, наличие капсулы и др.);

- место взятия биопсии соответственно описанию процесса, со ссылкой на маркировку флаконов и указанием количества объектов исследования.

Объекты исследования и их маркировка

Объектами морфологического исследования могут быть фрагменты органов или тканей, мазки (браш-, соскобы, отпечатки, нативные мазки) на предметных стеклах, жидкости (секреты желез, кровь, экссудаты, транссудаты, промывные воды). Фрагменты органов и тканей доставляются в патоморфологический отдел в фиксированном виде, метод фиксации материала выбирается в зависимости от задач морфологического исследования (формалин, параформ, глютаровый альдегид, этиловый спирт, заморозка, жидкость Карнуа, жидкость Боуэна и др.). Фрагменты тканей, взятые из различных по локализации макроскопической (эндоскопической, ультразвуковой, рентгенологической) картине патологических образований, обязательно помещаются в разные флаконы, которые маркируются отдельно, на каждом флаконе обязательно указываются фамилия и инициалы пациен-

та, номер флакона (если их несколько, то через дробь добавляется общее количество флаконов), количество объектов во флаконе. Эти данные должны совпадать с соответствующими записями в разделе "Характеристика патологического процесса" бланка направления. Мазки на предметных стеклах изготавливаются на месте получения материала. Предметные стекла маркируются перед нанесением биологического материала. На каждом предметном стекле указывается фамилия и инициалы пациента и номер мазка (если их несколько, то через дробь добавляется общее количество мазков). Мазки, изготовленные из биологического материала, взятого из различных по локализации микроскопической (эндоскопической, ультразвуковой, рентгенологической) картине патологических образований, обязательно маркируются отдельно. Эти данные должны совпадать с соответствующими записями в разделе "Характеристика патологического процесса" бланка направления.

Метод фиксации материала выбирается в зависимости от задач морфологического исследования (высушивание, формалин, этиловый спирт, ацетон, нефиксированный нативный мазок) (приложение 11). Жидкость для морфологического (цитологического) исследования помещаются в центрифужные пробирки, которые маркируются в соответствии с правилами, описанными выше. Как правило, фиксирующие жидкости изготавливаются в патоморфологическом отделе централизованно. При фиксации биологического материала в жидких агентах необходимо следить, чтобы соотношение объемов ткани и фиксатора было не менее 1:20, а жидкость при помещении в нее материала должна оставаться прозрачной. При загрязнении фиксирующей жидкости (кровью и др.) необходимо через 20-30 мин заменить жидкость на свежую. Жидкости, предназначенные для цитологического исследования, и нативные мазки доставляются в отдел не позднее, чем через 30 мин после получения материала.

Для иммуногистохимических исследований предпочтительно консервировать материал методом быстрого замораживания любым хладагентом (азот, фреон, хладон). В исключительных

случаях возможно использование метода замораживания при температурах в интервале от -20 до -5°C . Замороженный материал может сохраняться не более 1 сут. при температуре не выше -5°C . Доставку осуществлять в термосе со льдом. В ряде случаев возможно исследование материала, залитого в парафин (парафиновые блоки, или парафиновые срезы на предметном стекле). При этом следует иметь в виду обязательные требования к качеству срезов (не толще 5 мкм, не допускается использование белка для прикрепления срезов к стеклу) и некачественных предметных стекол (тонкие, бесцветные), не рекомендуется применять ранее использованные стекла.

Для электронно-микроскопического исследования наилучший результат дает фиксация материала немедленно после взятия биопсии в 4% растворе параформальдегиде, приготовленном на фосфатном буфере при pH 7,4-8,0. Фиксирующая жидкость готовится в лаборатории и по предварительной договоренности передается в лечебное учреждение. Фиксированный материал целесообразно хранить в холодильнике не более 5 сут.

Для иммуноцитохимического исследования клинический материал с доступных исследованию слизистых оболочек (уретра, цервикс, влагалище) получают с помощью стерильных ложечек Фолькмана. Инструмент вводят в уретру (цервикальный канал) на глубину 3-4 см у мужчин и 1-1,5 см у женщин. Материал собирают вращательным движением, инструмент вынимают, отделяемое наносят на специальные предметные стекла. Мазок тщательно высушивают на воздухе и фиксируют ацетоном или 96% этиловым спиртом в течение 5 мин.

Для культурального метода диагностики хламидийной инфекции забор исследуемого материала производится в стерильные пробирки. Соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала, уретры, влагалища, произведенный с помощью одноразовых стерильных зондов, переносится в пробирку с 1 мл Среды Игла. Взятые пробы можно хранить до 7 дней при $+4^{\circ}\text{C}$.

Для анализа специфического участка ДНК возбудителя забор исследуемого материала производится в стерильные пробирки. Соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала или уретры, произведенный с помощью одноразовых стерильных зондов, переносится в пробирку со 100 мкл физиологического раствора. Венозная кровь в количестве 1 мл или кусочек ткани слизистой оболочки желудка или двенадцатиперстной кишки объемом примерно 2 мм³ также помещается в пробирку. Взятые пробы клинического материала могут храниться при температуре -16-20°С в морозильной камере не более двух недель. Цельная кровь длительному хранению не подлежит, поэтому нужно отобрать сыворотку или плазму.

Сведения о предыдущих биопсийных исследованиях

В случаях, когда биопсийное исследование производится не впервые, необходимо с целью обеспечения преемственности морфологического анализа и оценки динамики патологического процесса указывать в бланке направления реквизиты всех предыдущих биопсий (регистрационные номера, дата исследования) и делать пометку «ПОВТОРНО». Если предыдущие исследования проводились в других лечебно-профилактических учреждениях, необходимо указывать наименование учреждения и дату исследования.

Материал каждой повторной биопсии обязательно анализируется в сравнении с результатами предыдущих биопсий.

Формулировка клинического диагноза (заключения)

Клинический диагноз формулируется в соответствии с принятыми классификационными схемами, в патогенетической последовательности, отклонение от которых не допускается.

При необходимости детализировать стандартную формулировку, все дополнения (в том числе диагностические вопросы, задачи, предположения) приводятся после основной записи. Патологический процесс, для морфологической верификации которого выполняется биопсия, в тексте заключения ставится на первое место.

При необходимости назначить выполнение нестандартного морфологического исследования, необходимо точно обозначить его задачу и по возможности согласовать с работниками отдела особенности забора материала, способ фиксации и другие организационные вопросы.

Необходимый минимальный объем биопсийного материала

Диагностическая ценность биопсийного и операционного материала определяется тем, насколько полно в нем представлена исследуемая патология. Таким образом, репрезентативность материала прямо влияет на качество и полноту морфологического диагноза. Необходимый для достоверного морфологического исследования объем материала рассчитывается методами вариационной статистики или подбирается эмпирически на основании анализа большого массива наблюдений (приложение 12).

Посуда

Флаконы, предметные стекла, пробирки перед использованием должны быть тщательно вымыты, обезжирены и высушены. Мытье посуды и предметных стекол производится водой при температуре 60-70°C с использованием любых моющих средств и щетки. После ополаскивания, посуда помещается на 20-30 мин в хромпик (специально приготовленная смесь хромо-вокалиевых квасцов и концентрированной серной кислоты), затем многократно ополаскивается дистиллированной водой и высушивается в сушильном шкафу или при комнатной температуре. Окончательная обработка посуды производится в смеси Никифорова.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МОРФОЛОГИИ



Развитие современных морфологических исследований, как в области практической патоморфологии, так и в экспериментальной медицине, базируется на совершенствовании методологических подходов. Традиционный путь, заключающийся в описании строения структур и их систематизации, становится все менее продуктивным в связи с трудностью постоянного анализа огромного количества фактов, получаемых на организменном, органном, тканевом, клеточном, ультраструктурном и молекулярном уровнях. Кроме того, морфологический метод изучения нормальных и патологически измененных органов основан на оценке зафиксированных, статичных моментов, соответствующих отдельным срокам исследования и взятия материала. Указанные обстоятельства создают дополнительные трудности в формировании динамических представлений о характере процесса в целом, о правильности диагностической оценки и тактики выбранного лечения.

Последние десятилетия развития биологии и медицины характеризуются расширением применения принципов и методов математических наук, интенсивным использованием количественных подходов, применением математического моделирования для доказательства обнаруженных закономерностей. Математические методы не только увеличивают точность описания изучаемых явлений, но и значительно усиливают логику доказательств диагностики и выбора методов лечения.

Количественная (математическая) патогистология только начинает развиваться, хотя впервые математическую статистику

в морфологии использовал L. Quetelet еще в 1835 году. Для обозначения комплекса количественных оценок в биологии F. Galton (1889) ввел термин «биометрия». Биометрия – это совокупность приемов математической обработки данных массового измерения различных признаков организма.

Роль математики и математической статистики в гистологии особенно возросла в последние годы в связи с развитием теории информации, кибернетики и многих связанных с ними областей математики, среди которых главное место занимают теория вероятностей, математическая статистика и математическая логика. Это требует специальной аппаратуры, ускоряющей сбор параметров с препаратов и их обработку по определенным алгоритмам. Разработка различных сканирующих систем для анализа клеток и тканей основывается на преобразовании информации о строении биологических объектов в цифровую форму. Однако, в настоящее время большинство морфометрических и стереометрических исследований в практической патоморфологии проводят простым («ручным») способом.

19.1. Основные методы морфометрии и стереометрии

Установлено, что визуальное различие в объеме, площади или длине структур воспринимаются исследователем только тогда, когда они достигают 30-50% от исходных величин. Это еще раз подтверждает необходимость количественной оценки состояния или динамики изменений структуры. Только тогда возможны четкие самостоятельные выводы, установление корреляционных и функциональных связей с результатами других методов исследования.

При проведении морфометрических исследований следует учитывать некоторые особенности. В предыдущих главах подробно описывались этапы изготовления гистологических препаратов. Механические свойства тканей не позволяют готовить тонкие срезы из свежезабранного материала. Необходимы фиксация, промывка, обезвоживание, пропитывание материала специальными средами (парафином, пластмассами). При такой об-

работке первоначальный объем кусочков уменьшается. На гистологическом срезе размеры структур не соответствуют прижизненным, поэтому исследователь вынужден или оперировать относительными величинами, или рассчитывать *коэффициент усадки материала*. Коэффициент усадки является результатом деления первоначального объема образца на его конечный объем. Если гарантирована стандартность проводки, то коэффициент усадки рассчитывают для некоторого количества образцов однородного материала и пользуются им во всех остальных подобных случаях.

Следующая особенность состоит в том, что гистологические препараты имеют определенную толщину, и, когда она приближается к размерам изучаемых структур, при микроскопии возникает «эффект экранирования» - наложения проекций объектов друг на друга. В таком случае размеры или результаты подсчета попадания точек и числа пересечений будут существенно искажаться. Необходимо выбирать толщину срезов для конкретной изучаемой структуры, приводя эффект экранирования к минимуму.

Необходимо, кроме того, предварительно решать вопрос о плоскости сечений. Как располагать блок относительно микротомного ножа зависит от ориентировки структур в исследуемом материале. Если структуры в образце расположены неупорядоченно, случайно, то такой материал называют изотропным. Изотропно располагаются, например, альвеолы легких, печеночные дольки, почечные тельца. В таких случаях срез можно делать в любой плоскости. Если изучаемые структуры в материале расположены упорядоченно или по принципу линейного градиента (например, расположение структур на поперечном срезе стенок полых органов), необходимо выбирать плоскость сечения при планировании исследования в зависимости от интересующих параметров и стандартизировать ее в дальнейшем. При просмотре препаратов, для обеспечения равновероятного попадания на любой участок, поля зрения выбирают случайно, но с соблюдением принципа сохранения представительности патологического процесса. Если срез содержит несколько различных мор-

фологических зон или участков с неоднородными проявлениями патологического процесса, случайное перемещение объектива выполняется в пределах каждого участка или зоны. Если срез содержит явные артефакты или дефекты, то такие участки в подсчет не включаются.

Большинство исследований включают разнообразные методики окраски. В этих случаях морфометрию можно проводить на разных срезах, с различными выявляемыми структурами, а по результатам получать общую количественную характеристику пространственной организации. При этом следует придерживаться стандартных условий проведения начальных этапов обработки материала (фиксация, промывка, обезвоживание, заливка).

Абсолютные и относительные величины, которые можно измерять в тканевых структурах, весьма разнообразны. Настоящее пособие не претендует на полноту изложения, поэтому мы остановимся на методиках измерения и расчета лишь некоторых из них.

Гистологический срез – это случайное сечение трехмерной структуры, поэтому в поле зрения микроскопа морфологические объекты могут быть представлены площадью сечения различных геометрических фигур, линией или точкой. Понятие «точка» в данном случае является относительным, так как при большем увеличении микроскопа «точка» может приобрести реальные размеры и форму. В таком случае правильнее пользоваться относительными величинами. Если количество объектов N находится на площади A , то на единице площади должно находиться N/A объектов. Эту величину называют *удельным количеством объектов*. При микроскопии подсчитанное количество обнаруженных в поле зрения объектов делят на величину поля зрения, которая обычно указывается в паспорте микроскопа для каждого увеличения.

Для оценки *линейных размеров* объектов используют стандартные окулярные линейки, цену деления которых определяют объектмикрометром. Прямым измерением можно получить диаметр (сосуда, клетки, ядра), длину (клетки, трубчатой структуры), высоту (ворсинки), толщину (стенки).

Измерение *площади* тканевых структур проводят с помощью «тестовых систем». Тестовые системы представляют совокупность точек, параллельных линий, концентрических окружностей. Тестовую систему можно размещать в окуляре микроскопа (окулярная вставка) или проецировать на тестовую систему микроскопическое изображение. Затем перемещают гистологический срез для того, чтобы тестовая система попадала на новый участок, выбранный случайно. Так просматривается необходимое количество полей зрения – от 5 до 100 в зависимости от выборки (объем выборки определяется статистическими методами).

Существует несколько методов определения *удельной площади* объектов в поле зрения. Рассмотрим метод точечного счета и метод линейного интегрирования.

Метод точечного счета формулируется следующим образом: если на плоскость наблюдения, содержащую несколько объектов, наложить систему точек, то отношение количества точек, попавших на объекты к общему числу точек равно удельной площади объектов. Для определения удельной площади объектов в гистологическом препарате методом точечного счета можно использовать квадратную тест-решетку, узлы которой образуют систему точек. Необходимо учитывать и то, что часть точек неизбежно попадет на линию периметра исследуемого объекта. При подсчете, количество попаданий точек на границу объекта необходимо уменьшить в два раза и сложить с количеством точек, попавших на объект. Размеры точек тестовой системы должны быть существенно меньше исследуемых объектов. Это важно учитывать при изготовлении окулярной вставки и при выборе увеличения микроскопа.

Метод линейного интегрирования состоит в том, что если на плоскость наблюдения, содержащую несколько объектов, наложить систему линий, то отношение суммарной длины отрезков линий, попавших на плоскость объектов, к общей длине линий равно удельной площади объектов. Таким образом, если в поле зрения микроскопа находится несколько объектов разных типов, то при произвольном наложении линейки часть ее длины

попадает на пустую площадь, а часть – на площадь объектов. Такие отрезки попадания называют хордами. Для определения удельной площади объектов нужно суммировать длину хорд сечения и разделить эту сумму на длину линейки. Как и метод точечного счета, метод линейного интегрирования является вероятностным, статистическим, требует некоторого количества измерений.

Перечисленные выше методы позволяют характеризовать плоскость препарата. Вместе с тем интереснее и правильнее количественно характеризовать трехмерную организацию органов и тканей.

Удельный и абсолютный объем. Если из образца ткани готовится гистологический срез, то удельная площадь сечений объектов на площади среза соответствует удельному объему объекта в образце. Удельную площадь, как описывалось выше, можно измерять точечным счетом или линейным интегрированием. Таким образом, если на случайный срез образца наложить тестовую систему точек или линий, то отношение числа точек, попавших на объект, к общему числу точек равно отношению суммы хорд сечения к длине секущих линий, равно удельной площади сечения объектов и равно удельному объему объектов в образце. Это положение является основополагающим в стереометрии и называется принципом Кавальери-Акера-Глаголева.

Для определения абсолютного объема необходимо перед тем, как готовить гистологические срезы, измерить объем целого органа или ткани, из которых берутся образцы. Тогда абсолютный объем объекта можно будет рассчитать как произведение удельного объема и объема органа. Вероятно, измерение абсолютного объема более уместно в экспериментальной морфологии, чем в практической, использующей часто образцы небольших биопсийных размеров. То же можно отнести и к абсолютной площади поверхности, и к абсолютной длине, и к абсолютному количеству.

Авторы данного пособия преднамеренно не углублялись в расшифровку математических расчетов всех интересующих

морфолога параметров, характеризующих состояние органа или ткани. На этот счет существуют специальные, более подробные издания, которыми любой заинтересовавшийся читатель может воспользоваться.

19.2. Статистические методы оценки количественных данных, полученных в процессе морфометрического анализа

Адекватная оценка характера и степени патоморфологических изменений тканей достигается просмотром достаточно большого количества полей зрения. Полученный при этом ряд цифровых значений называется вариационным рядом (или выборкой). Выборку, отражающую свойства всей совокупности, называют представительной. Анализ вариационных рядов осуществляется с помощью различных статистических методов. При этом исследователь решает два типа задач: 1) описание данных и 2) оценка статистической значимости различий и проверка гипотез.

19.2.1. Описание полученных данных

Задачами описания данных занимается так называемая описательная статистика. Свойства любого распределения (совокупности чисел) отражают следующие параметры: 1) среднее значение и медиана, 2) дисперсия или стандартное отклонение, которые характеризуют рассеяние значений случайной величины относительно ее среднего значения и процентиля, 3) асимметрия распределения, характеризует распределение в плане его симметрии относительно среднего значения, 4) эксцесс распределения, характеризует крутизну спада графика распределения в области среднего значения случайной величины. Эксцесс и асимметрия отражают степень нормальности распределения.

Если значения интересующего нас признака для большинства измерений (представительная выборка) близки к среднему и с равной вероятностью отклоняются от него в большую и меньшую стороны (нормальное или гауссово распределение), то лучшими

характеристиками совокупности будут само выборочное среднее и выборочное стандартное отклонение. Чем больше выборка, тем точнее оценка совокупности. Поэтому для характеристики точности выборочных оценок используют *стандартную ошибку среднего* - она позволяет оценить точность, с которой выборочное среднее характеризует значение среднего по всей совокупности. Когда значения признака распределены несимметрично относительно среднего (распределение отличное от нормального), совокупность лучше описывать с помощью медианы, моды и процентилей. *Медиана* – это значение, которое делит распределение пополам: половина значений – больше, половина – меньше. *Процентили* – характеристика разброса, например, значения не выше которых оказались 25 и 75% или 5 и 95% результатов измерения. Эти величины называются соответственно 25-м и 75-м, 5-м и 95-м процентилем. Чаше используют 25-й и 75-й процентили. *Мода* – это наиболее часто встречающееся значение.

19.2.2. Оценка статистической значимости различий и проверка гипотез

Эта задача решается с помощью методов параметрической и непараметрической статистики и использования соответствующих критериев. При этом конкретное применение того или иного метода зависит от характера и дисперсии сравниваемых распределений, а также от объема выборки (количество измерений). До тех пор пока выборка достаточно большая (≥ 100 наблюдений), можно считать, что выборочное распределение нормально, даже если вы не уверены, что распределение переменной в популяции, действительно, является нормальным. Тем не менее, если выборка очень мала, то критерии, основанные на нормальности, следует использовать только при наличии уверенности, что переменная действительно имеет нормальное распределение. Однако нет способа проверить это предположение на малой выборке.

Параметрические методы могут быть использованы только при четком соблюдении следующих условий: 1) распределение близко к нормальному, 2) сравниваемые совокупности должны

иметь одинаковые дисперсии, различными могут быть только значения средних, 3) измеряемый признак должен быть числовым (представленным конкретным числом).

Во всех иных случаях, при выборках малого объема (менее 20) с переменными, про распределение которых мало что или вообще ничего не известно, используются непараметрические методы. Эти методы специально разработаны для тех ситуаций, достаточно часто возникающих на практике медицинских исследований, когда исследователь ничего не знает о параметрах исследуемой популяции (отсюда и название методов - *непараметрические*). Непараметрические методы не основываются на оценке параметров (таких как среднее или стандартное отклонение) при описании выборочного распределения интересующей величины.

Для каждого параметрического критерия имеется непараметрический аналог (таблица 3). Эти критерии можно отнести к одной из следующих групп:

- 1) критерии различия между группами (независимые выборки);
- 2) критерии различия между группами (зависимые выборки);
- 3) критерии зависимости между переменными.

Различия между независимыми группами. Обычно, когда имеются две выборки (например, мужчины и женщины), то используют *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок. Непараметрическими альтернативами этому критерию являются: критерий *серий Вальда-Вольфовица*, *U* критерий *Манна-Уитни* и *двухвыборочный критерий Колмогорова-Смирнова*. Для нескольких групп используется дисперсионный анализ (критерий *F*) и специальные методы множественного сравнения. Их непараметрическими аналогами являются: ранговый дисперсионный анализ *Краскела-Уоллиса* и *медианный тест*.

Различия между зависимыми группами. При сравнении двух переменных, относящихся к одной и той же выборке (например, анализы больных одной и той же группы в начале и в конце лечения), обычно используется *t*-критерий Стьюдента для *зависимых выборок*. Альтернативными непараметрическими тестами

являются: критерий *знаков* и критерий *Вилкоксона парных сравнений*, критерий *хи-квадрат Макнемара*. Если рассматривается более двух переменных, относящихся к одной и той же выборке, то обычно используется дисперсионный анализ (ANOVA) с повторными измерениями. Альтернативным непараметрическим методом является *ранговый дисперсионный анализ Фридмана* или *Q* критерий *Кохрена*. *Q* критерий Кохрена используется также для оценки изменений частот (долей).

Таблица 3

Параметрические и непараметрические методы

Группы	Анализ	
	Параметрический	Непараметрический
Критерии различия между группами (независимые выборки)	- t-критерий Стьюдента для независимых выборок (две группы)* - дисперсионный анализ (несколько групп)	- критерий серий Вальда-Вольфовица, U-критерий Манна-Уитни и двухвыборочный критерий Колмогорова-Смирнова - ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса и медианный тест (несколько групп)
Критерии различия между группами (зависимые выборки)	- t-критерий Стьюдента для зависимых выборок - хи-квадрат Макнемара (категориальные переменные) - дисперсионный анализ (ANOVA) с повторными измерениями (более двух переменных)	- критерий знаков и критерий Вилкоксона парных сравнений - ранговый дисперсионный анализ Фридмана или Q критерий Кохрена (последний применяется, например, если переменная измерена в номинальной шкале). Q критерий Кохрена используется также для оценки изменений частот (долей)
Критерии зависимости (связи) между двумя переменными	- коэффициент корреляции Пирсона	- статистики Спирмена R, тау Кендалла и коэффициент Гамма - для категориальных переменных - Хи-квадрат, Фи коэффициент, точный критерий Фишера, критерий зависимости между несколькими переменными (коэффициент конкордации Кендалла)

Примечание. * - t-критерий Стьюдента может быть использован для проверки гипотезы о различии средних только для двух групп, если сравнивается большее число групп, необходимо применять дисперсионный анализ и методы множественного сравнения (поправка Бонферрони, критерий Ньюмена-Кейлса, критерий Тьюки). Для сравнения нескольких групп с контрольной используют поправку Бонферрони и критерий Даннета.

Зависимости между переменными. Для того, чтобы оценить зависимость (связь) между двумя переменными, обычно вычисляют коэффициент корреляции. Непараметрическими аналогами стандартного коэффициента корреляции Пирсона являются статистики *Спирмена R*, *tau Кендалла* и коэффициент *Гамма*, *Хи-квадрат*, *Фи* коэффициент, *точный критерий Фишера*, критерий зависимости между несколькими переменными, так называемый *коэффициент конкордации Кендалла*. Коэффициент корреляции (Пирсона или Спирмена) показывает, насколько тесно связаны между собой две рассматриваемые характеристики (например, вес и рост), однако он не позволяет непосредственно оперировать значениями одной характеристики (вес) для определения другой. Эта проблема решается с помощью методов линейной и нелинейной регрессии. Для оценки зависимости некоторого признака (например, вес) одновременно от нескольких других признаков (рост, пол, возраст) используют методы многомерного корреляционного и регрессионного анализа.

19.2.3. Анализ качественных признаков

Все вышеизложенные статистические процедуры предназначены для анализа количественных признаков (например, объем легких, количество эритроцитов, лейкоцитов). Анализ качественных признаков (например, красный или белый) осуществляется путем подсчета доли от общего числа объектов на то или иное значение (25% черных, 75% рыжих). Затем, как и при анализе количественных признаков, рассчитывают среднее значение доли, стандартное отклонение и стандартную ошибку доли. Сравнение долей осуществляется с помощью критерия “z” с поправкой на непрерывность Йейтса, аналогичного t-критерию Стьюдента. Критерий “z” используется при двух значениях качественного признака (да или нет, розовый или синий). Для множественного сравнения применяется метод, аналогичный дисперсионному анализу – критерий χ^2 (хи-квадрат, один из непараметрических критериев) и точный критерий Фишера.

При оценке вероятности отсутствия влияния того или иного действия на изучаемый объект (нулевая гипотеза) полученные результаты вышеназванных критериев значимости (F , t , z и др.) сравнивают с их критическими значениями, которые представлены в специально разработанных таблицах. Критические значения зависят от количества измерений и уровня значимости. Чувствительность любого критерия возрастает с ростом наблюдаемых различий (разность средних) и снижается с ростом разброса значений (стандартное отклонение выборочной средней). С увеличением объема выборки (численности групп) чувствительность критерия увеличивается.

Как правило для оценки статистической значимости различий и проверки гипотез используют несколько критериев, особенно это касается непараметрических методов анализа. Каждая непараметрическая процедура имеет свои достоинства и свои недостатки. Возможно, результаты проверки (разными тестами) будут различны. В таком случае следует попытаться понять, почему разные тесты дали разные результаты. С другой стороны, непараметрические тесты имеют меньшую статистическую мощность (менее чувствительны), чем их параметрические конкуренты, и если важно обнаружить даже слабые отклонения, следует особенно внимательно выбирать статистику критерия.

Расчет статистических параметров - трудоемкая и довольно сложная процедура. Поэтому для стандартизации и облегчения расчетов в последнее время используются различные пакеты прикладных программ для персонального компьютера. Наиболее распространены такие программы как "Excel", "STATISTICA", "SPSS", "STATGRAPHICS", "SYSTAT", "SAS" и "BMDP", которые позволяют производить весь спектр статистической обработки полученных данных и отобразить результаты статистических исследований в доступной форме (таблицы, различные типы графиков).

Так, при использовании программы "STATISTICA" на первом этапе анализа полученных количественных данных с помощью раздела «Descriptive Statistics» определяют основные статистические характеристики изучаемых параметров (средняя,

медиана, квартили, дисперсия, стандартное отклонение, стандартная ошибка, асимметрия и эксцесс). Затем с помощью «Frequency Tables» проводят тест на нормальность распределения (критерии Колмогорова-Смирнова).

На втором этапе исследования, в случае нормального или близкого к нормальному распределения, используют методы параметрической статистики. Различия между независимыми выборками определяют с помощью t-критерия для независимых выборок и дисперсионного анализа, различия между зависимыми выборками – с помощью t-критерия для зависимых выборок и дисперсионного анализа (ANOVA) (Breakdown & one-way ANOVA). Степень зависимости между двумя переменными устанавливают с помощью коэффициента корреляции Пирсона (Correlation matrices). В случае ненормального распределения или если не удалось установить тип распределения используют методы непараметрической статистики. Различия между независимыми выборками определяют с помощью критерия Вальда-Вольфовица, U критерия Манна-Уитни, двухвыборочного критерия Колмогорова-Смирнова, рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса и медианного теста. Для установления различия между зависимыми выборками используют критерий знаков и W-критерий Вилкоксона парных сравнений, а также ранговый дисперсионный анализ Фридмана или Q критерий Кохрена. Степень и характер зависимости (функциональная, стохастическая) между двумя переменными устанавливают с помощью статистики Спирмена R, тау Кендалла и коэффициента Гамма. Для категориальных переменных применяют Хи-квадрат, Фи коэффициент, точный критерий Фишера, критерий зависимости между несколькими переменными так называемый коэффициент конкордации Кендалла (Nonparametrics/Distrib.).

Изучение зависимости одного параметра от другого осуществляют с помощью регрессионного анализа (Multiple regression).

Интегральную оценку изучаемых групп по всей совокупности полученных параметров осуществляют с помощью метода кластерного анализа (Cluster Finalysis), в результате которого

выявляют однотипные объекты и объекты максимально отличающиеся между собой.

Все вышензложенное является только основой для понимания современных методов статистического анализа полученной информации. Более детальное описание этих методов можно найти в специальных учебниках и монографиях.

19.3. Компьютерная морфометрия цифровых видеонизображений

В современных условиях широко применяется исследование свойств клеток, тканей и органов в проходящем свете видимого или рентгеновского диапазона с последующей компьютерной оценкой видеонизображений согласно статистике серых уровней, которая коррелирует с показателями денситометрии.

Существуют различные специализированные программы компьютерной обработки видеоинформации. Полезную информацию можно получить при помощи доступных и широко применяемых приложений MS Office, в частности Adobe PhotoShop 5.0 и выше.

Ход метода

1. Получают цифровые видеонизображения объектов в фиксированных для каждого эксперимента условиях освещения, мощности рентгеновского облучения и стандартизации других этапов подготовки материала.

2. Используют шкалу сравнения (линейка, миллиметровая сетка и т.д.) для определения величины увеличения объекта, последующего перевода его параметров в абсолютные величины.

3. Цифровые изображения объектов переводят в оттенки серого цвета.

19.3.1. Определение размера, площади непрозрачного объекта

Данный метод позволяет фотометрически получить количественные характеристики непрозрачного объекта (площадь,

плотность). Таким образом, вычисляют относительную (пиксель) и абсолютную площадь объекта, относительную (условные единицы оптической плотности) и абсолютную (по калибровочном графику) плотность объекта.

Ход методики

1. В программе Adobe PhotoShop фиксируют при помощи «Навигатор» оптимальное увеличение изображения.

2. На панели инструментов при помощи «прямоугольное выделение» задают необходимый размер квадрата, командами «изображение» – «гистограмма» определяют количество точек (пиксель), укладываемых в выбранную площадь. Это позволяет в дальнейшем переводить относительные единицы площади объекта в абсолютные.

3. Линейный размер объекта определяют инструментом «мера» - через команду «Инфо» - размер в сантиметрах или пиксель, учитывая увеличение объекта.

4. Инструментом «пипетка» задают преобладающий серый оттенок объекта, для инструмента «волшебная палочка» задают требуемый уровень чувствительности (через команду «опции»), чтобы охватить весь объект.

5. Через цепочку «изображение» – «гистограмма» определяют площадь объекта в пиксель и соответствующую данной площади яркость (команда «значение»).

19.4. Компьютерная трехмерная реконструкция биологических объектов с использованием серийных срезов (А.И.Буданцев, А.Р.Айвазян)

В настоящее время экспериментальные результаты в цитологии и гистологии представляются в виде описания и анализа двухмерных отображений структуры тканей, клеток и межклеточных пространств, полученных методом зарисовок и разных видов микроскопирования, включая современные пленочные и цифровые фотоаппараты, видеокамеры. Совершенно очевидно, что «плоскостное» гистологическое описание часто в разной

степени не соответствует истинной трехмерной морфологической организации тканей и клеток. Это особенно сильно проявляется при анализе небольшого числа последовательных срезов тканей, а визуальный анализ больших серий срезов представляет чрезвычайно сложную и трудоемкую задачу.

При описании гистологических препаратов фигурируют такие характеристики, как форма клетки и ядер, площадь клетки, ядерно-цитоплазматическое отношение, наличие отростков и степень их ветвления, форма взаимного расположения и контакта клеток, форма и величина межклеточного пространства. Однако, реально исследователь имеет дело с изображениями двумерных профилей клеток, внутриклеточных структур и других образований. На основе ряда допущений, представляя профили структур на срезах как некоторые простые геометрические фигуры, можно условно рассчитать объемы структур, площади их поверхностей и другие морфометрические параметры.

Субъективность и неточность описания структур, реально существующих в тканях, таких как трубки, тяжи, перегородки, нервные волокна и даже форма клеток при анализе единичных гистологических срезов, отмечены в классическом руководстве по гистологии А.Хэма и Д.Кормака. При переходе к трехмерному анализу структуры тканей с использованием современных компьютерных технологий резко снижается субъективность анализа объемной модели структуры изучаемых объектов и увеличивается точность и реалистичность таких моделей, что необходимо для количественного морфологического анализа. Естественно, что построение трехмерной (3D) модели дает экспериментатору неограниченные возможности для качественного и количественного анализа форм структур и морфологического проявления их взаимодействия в объеме ткани.

Две основные задачи составляют основу классической количественной двумерной гистологии: а) изучение формы и структуры клеток, изучение организации межклеточного пространства и межклеточной коммуникации; б) количественный анализ числа клеточных и тканевых структур и их геометрических характеристик. Эти же основные задачи стоят и перед 3D-гистологией. Раз-

ница состоит в том, что основой 3D-гистологии являются математически обоснованные модели пространственной организации клеток и тканей, включающие их реальные объемные параметры.

19.4.1. Источники искажений геометрической реалистичности строения ткани при 3D-гистологии

Три группы процедур составляют основу 3D-гистологии биологических объектов на основе серийных срезов: а) получение серийных срезов тканей с использованием гистологических методов; б) ввод изображений в компьютер и в) 3D-Р серии срезов (получение и анализ 3D-моделей структур, морфометрия). Совершенно очевидно, что точность или геометрическая реалистичность 3D-моделей клеток и тканей зависит от тех погрешностей, которые нарушают нативную структуру ткани на всех перечисленных этапах 3D-Р.

Хорошо известно, что гистологические фиксаторы приводят к значительным изменениям объема ткани. Величина сжатия или набухания ткани во время фиксации зависит не только от состава фиксирующих растворов, но и от размера образца ткани, температуры и может достигать значительных размеров. Так, например, при использовании компьютерного анализа срезов сердца новорожденных крыс, фиксированных забуференным формалином, было показано, что происходит общее сжатие ткани в направлении резки ткани, залитой в полимерный материал (парапласт) на 25-30%, незначительные изменения размеров наблюдались в направлении, перпендикулярном направлению резки.

По другим данным, во время микромирования срез испытывает сжатие в плоскости резки до 50% вдоль направления движения ножа микротом. Сжатие ткани во время резки зависит от заливочного материала: в большей степени сжатию подвержены срезы тканей, заключенных в «мягкие материалы» (парафин), в меньшей — при заливке в «твердые материалы» (эпоксидные смолы). Площадь срезов может искажаться не только в направлении резки, но и в любом другом непредсказуемом направлении, что связано с разной локальной плотностью и толщиной ткани, оседанием на срезы пылинок, загрязне-

нием предметных стекол, приводящих к локальному изменению адгезивности срезов к стеклу.

Неравномерные локальные изменения размеров срезов зависят от свойств внутритканевых структур. Например, сжатие на продольных срезах скелетных мышц более выражено в области А-полосок по сравнению с областью Z-линий. Искажения площади срезов, незаметные на отдельных срезах, становятся отчетливо видны при построении поверхности 3D-модели по контурам реконструируемых структур: модели имеют характерную «складчатость» или, в крайнем проявлении, «рваные» края из-за хаотичного несовпадения контуров структур на соседних срезах. Искажения могут быть внесены в 3D модель в результате вариации толщины среза в серии препаратов, процедуры окрашивания, локального нагревания препарата электронным пучком при электронной микроскопии и др.

При применении аналоговых телевизионных камер для ввода изображений в компьютер используются специальные платы оцифровки («грабберы»). При достаточном числе элементов матриц камер («мегапиксельные камеры») можно получить отличное качество изображений без значимых нарушений геометрии исследуемых клеток и тканевых структур. При использовании камер с матрицами, обладающими недостаточным числом элементов, появляется «пиксельность» изображений, размытие границ структур внутри ткани и, в целом, это приводит к нарушению качества изображения объектов.

Для получения изображений структур большой площади с хорошим разрешением можно использовать метод создания панорам с использованием стандартных графических редакторов (Paint, CorelDraw и др.) или специальных программ для сборки панорамных изображений (программы 3DDOCTOR и IMOD). В ранних работах применяли специальную установку, состоявшую из микроскопа с приводами предметного столика, управляемыми компьютером, и фотографической камеры. Компьютер автоматически заполнял заранее определенную сетку фрагментами контуров реконструируемых объектов по мере очерчивания фрагментов изображения среза на графическом планшете в порядке их фотографирования.

19.4.2. Технология компьютерной 3D-гистологии

Разработанные в настоящее время приемы работы с изображениями при 3D-гистологии включают следующие процедуры:

- а) улучшение качества изображений (яркость, контраст и др.);
- б) оконтуривание (выбор контуров реконструируемых структур);
- в) масштабирование изображений для абсолютных количественных измерений геометрических параметров;
- г) выравнивание серии изображений срезов относительно друг друга для правильной подготовки серии изображений к сборке 3D-модели объекта;
- д) сборка изображений отдельных сечений объекта в трехмерный пакет (стек) для последующей организации поверхности 3D-модели;
- е) получение «гладких моделей» (организация гладкой поверхности моделей);
- ж) анализ 3D-модели (формы, геометрических параметров, анимация и послойная визуализация, геометрические «примитивы» и др.).

Рассмотрим более подробно некоторые из перечисленных этапов обработки изображений при 3D-гистологии, особо обращая внимание на возможность появления искажений геометрии клеточных и тканевых структур.

Одна из важнейших операций технологии 3D-P, связанная с получением контуров реконструируемых структур на изображении препарата, осуществляется путем ручного оконтуривания реконструируемых структур или при помощи автоматической трассировки. При ручном оконтуривании оператором последовательно указываются точки контура, которые затем соединяются сглаженной кривой (би-сплайном) и по данной кривой экстраполируются дополнительные точки контура, что приводит к получению более точного контура изучаемой структуры. При автоматической трассировке контуров используется «пороговый» алгоритм. Например, при поиске границ структур изображение модифицируется с определенным порогом в бинарное

изображение, что автоматически определяет положение контуров структур. Более сложным вариантом данного алгоритма является «ранжирование» пикселей серошкального изображения на ряд групп, и обозначение каждой группы некоторым псевдоцветом, что позволяет провести трассировку не одного, а нескольких структур. Функция «ранжирования» включена в программу 3D-DOCTOR. Пороговый алгоритм не всегда точно определяет границу структур на срезе, поэтому его применение требует предварительного тестирования.

Полностью автоматическая трассировка контуров применяется только в случаях, когда граница структур резко выделяется относительно фона. Однако на гистологическом препарате, как правило, границы структур не являются достаточно контрастными и четкими, а выглядят прерывистыми или неравномерно окрашенными. Поэтому контуры, полученные автоматической трассировкой, как правило, имеют «рваные» края, и для построения поверхности 3D-модели контуры нуждаются в сглаживании. Процедура сглаживания, в свою очередь, не должна вместе с «помехами» уничтожать функционально значимые детали и искажать реальную границу объекта.

Калибровка включает приведение относительного размера структур на изображении среза к метрическим величинам, что необходимо для получения абсолютных количественных параметров 3D-модели (объем реконструируемых объектов, площадь поверхности и т. д.). Обычно эта операция проводится с помощью измерений размеров структур объект-микрометром и перевода их линейных размеров на изображение. Кроме этого, изображения серии срезов располагаются по оси Z, в соответствии с толщиной срезов, что необходимо для получения объемной модели без искажения ее формы.

Исправление искажений геометрии клеток и тканей, возникающих в процессе гистологической обработки тканей, и выравнивание изображений срезов относительно друг друга являются ключевой процедурой процесса объемной реконструкции. Качество проведения этой процедуры в значительной степени определяет точность 3D-модели и, соответственно, точность ко-

личественных измерений геометрических параметров реконструируемого объекта.

Задача выравнивания ориентации серии срезов обычно решается при помощи маркеров: а) искусственно внесенных на разных стадиях подготовки серийных срезов («искусственные маркеры») и б) внутритканевых и внутриклеточных структур, используемых в качестве маркеров («внутренние маркеры»).

Можно сформулировать ряд общих принципов, которые необходимо учитывать при эффективном использовании искусственных маркеров: а) они должны однозначно определять взаимное расположение срезов и включать не менее двух реперных точек. Для исправления деформации среза необходимо иметь, как минимум, три маркирующих точки; б) находится максимально близко к реконструируемому объекту, но не повреждать его; в) располагаться строго перпендикулярно плоскости микротомирования; г) легко резаться вместе с образцом, без каких-либо смещений относительно образца и не выпадать при резке; д) иметь четкие границы. Осевые маркеры типа отверстий и волокон различного происхождения должны иметь значительно меньшие размеры, чем реконструируемые структуры; е) маркирующие структуры должны легко идентифицироваться на изображении среза ткани.

В качестве внутренних маркеров используются структуры внутри самой ткани, ориентация профилей которых не изменяется, во всяком случае, в изображениях двух соседних срезов серии — профили сосудов, нервных волокон, митохондрий и других органелл.

Коррекция искажений структур в изображениях отдельных срезов ткани и выравнивание положения срезов в серии при использовании внутренних маркеров выполняются интерактивно при визуальном анализе изображений на соседних срезах — метод оптического и физического дисектора. При использовании ограниченного числа внутренних маркеров могут возникать искажения, когда в качестве маркеров учитываются структуры, расположенные не перпендикулярно плоскости резки, или маркерные структуры, имеющие переменный диаметр в плоскости

двух последовательных срезов. Если реконструируемый объект окружен большим количеством разнонаправленных осевых структур (сосудов, нервов) и для совмещения каждой пары срезов можно выбрать новый набор «маркерных» профилей, вероятность ошибки ориентации сводится к минимуму.

При использовании внутренних маркеров практически невозможно учитывать искажения, возникающие в ходе гистологических процедур, которые обсуждались выше, и при имитации 3D-модели можно полагаться только на опыт исследователя. Оптимальным решением является совмещение применения искусственных и внутренних маркеров, а использование только внутренних маркеров – не более чем компромисс между надежностью результатов и трудозатратами на внесение маркеров.

В процессе выравнивания необходимо видеть совмещаемые структуры одновременно на изображениях двух последовательных срезов, что достигается специальными приемами. Выравнивание изображений можно проводить после оконтуривания структур, выбранных для построения 3D-модели (программа SURFdriver).

Стек для построения 3D-модели представляет набор контуров реконструируемого объекта в 3-х мерном пространстве. Если анализируются несколько объектов, вводится информация о принадлежности каждого контура к определенному объекту.

Получение 3D-модели на основе стека изображений контуров сводится к построению гладких или каркасно-проволочных поверхностей. Для этой цели используются инструменты, входящие в набор специальных программ для 3D-гистологии. Стеки изображений можно экспортировать в специальные графические редакторы, например, 3D Studio Max для визуализации объемных моделей и манипуляций с ними (анимация, вход во внутреннее пространство модели, расчет объемных геометрических параметров и т. д.). Обычно на этой, заключительной, стадии 3D-гистологии хорошо выявляются все неточности предыдущей работы с изображениями: оконтуривание, коррекция и выравнивание изображений, сборка стека.

19.4.3. 3D-гистология и морфометрический анализ

В современных программах набор измеряемых параметров достаточно широк: объем и площадь поверхности реконструируемых объектов, длина контуров и описываемая ими площадь, координаты центров контуров, линейные расстояния между двумя указанными на реконструированной модели точками, угол между тремя точками и др.

Оцифрованное изображение состоит из дискретных элементов – пикселей и в простейшем случае черно-белого изображения, когда черные пиксели соответствуют объектам, а белые – фону, автоматический подсчет пикселей соответствует подсчету точек на налагаемой на срез решетке и дает значение площади объектов на срезе. При приведении размера пикселя к реальным размерам структур на изображении (калибровке) можно рассчитать абсолютное значение площади. Объем объектов на серии срезов равен сумме площадей объектов, умноженной на толщину среза (так реализован расчет объема в программе Scion Image). При применении процедуры оконтуривания в сочетании с калибровкой изображений серии площадь полигона контура непосредственно рассчитывается из координат вершин полигона. Объем воксельной модели можно определить прямым подсчетом количества вокселей, составляющих модель (программа VoxBlast).

Точность и реалистичность объемных моделей, организованных на основе серийных срезов, зависит и от некоторых компьютерных процедур с оцифрованными изображениями: оконтуривания выбранных для реконструкции структур, коррекции искажений срезов ткани и выравнивания серийных сечений в стек, формирования поверхности гладких моделей и др. Однако можно с уверенностью отметить, что в настоящее время развитие компьютерных средств для 3D-гистологии достигло значительных успехов, и существующие компьютерные программы позволяют решать широкий круг задач в 3D-гистологии.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Классификация типов очищенной воды

Тип воды	Электропроводность, мкс/см 25°C	Электрическое сопротивление, МОм/см	Силикаты, мг/л	Тяжелые металлы мг/л	Na ⁺ мг/л	CaCO ₃ -мг/л	Аммоний мг/л	Бактерии кол/л
Водопроводная	-	0,004	1	1	65	35	1	10
Дистиллированная (лабораторная)	10-2	0,1-0,5	0,5-0,1	1-0,5	2-5	2-5	0,01	10
Бидистиллированная (лабораторная)	1-2	0,5-1	0,1-0,7	0,1-0,8	0,1-0,5	0,5-1	0,01	10
Бидистиллированная +деионизированная (аналитическая)	1	1-2	0,1	0,01	0,1	0,1	0-0,01	5
Тридистиллированная +деионизированная (реагентная)	0,05	18	0,01	0,01	0,01	-	0,01	1

Состав сбалансированных солевых растворов
Дульбекко, Хэнкса и Эрла

Компоненты ССР, г/л	Дульбекко			Хэнкса		Эрла	
		без Ca ⁺⁺	без Ca ⁺⁺ и Mg ⁺⁺		без Ca ⁺⁺ и Mg ⁺⁺		без Ca ⁺⁺ и Mg ⁺⁺
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,133	-	-	-	0,185	0,265	0,265
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1	0,1	-	-	-	-	-
KCl	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4
NaHPO ₄	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-
NaCl	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	6,8	6,8
NaH ₂ PO ₄	1,15	1,15	1,15	0,05	0,05	0,122	0,122
Mg ₂ O ₄	-	-	-	0,098	-	0,098	-
Na ₂ HCO ₃	-	-	-	0,35	0,35	2,2	2,2
KHPO ₄	-	-	-	0,06	0,06	-	-
Глюкоза	-	-	-	1,0	1,0	1,0	1,0

Приложение 3

Соотношение ингредиентов
при приготовлении 0,1 М фосфатного буфера (pH 5,7-8,0)

pH среды	Раствор А (мл)	Раствор Б (мл)
5,7	93,5	6,5
5,9	90,0	10,0
6,0	87,7	12,3
6,2	81,5	18,5
6,4	73,5	26,5
6,6	62,5	37,5
6,8	51,0	49,0
7,0	39,0	61,0
7,2	28,0	72,0
7,4	19,0	81,0
7,7	13,0	87,0
7,8	8,5	91,5
8,0	5,3	94,7

Приложение 4

Соотношение ингредиентов
при приготовлении трис-НСl буфера (pH 7,19-9,10; 0,05 М)

pH	0,1 н HCl
7,19	45,0
7,36	42,5
7,54	40,0
7,66	37,0
7,77	35,0
7,87	32,5
7,96	30,0
8,05	27,5
8,14	25,0
8,23	22,5
8,41	17,5
8,74	10,0
9,1	5,0

**Некоторые характеристики буферных систем,
применяемых в биологических исследованиях**

№	Название	М.в. (D)	pKa (25°C)	Границы pH	Рабочая концентра- ция (мМ)
1	(MES) 4-морфолино-этаносульфоновая кислота	195,2	6,1	5,5-6,7	10-20
2	(PIPES) 1.4-пиперавиндиэтаносульфоновая кислота	302,4	6,8	6,1-7,5	10-20
3	(ADA) N [2-адетамидо] имино-ацетоновая кислота	190,2	6,6	6,0-7,2	10-20
4	(ACES) N (2-ацетамидо) 2-амино-этаносульфоновая кислота	182,2	6,8	6,1-7,5	10-20
5	(MOPSO) 3[N-морфолино]-2-гидроксипропаносульфоновая кислота	225,3	6,9	6,2-7,9	10-20
6	(BES) N, N-бис (2-гидроэтил)-2-аминометаносульфоновая кислота	213,2	7,1	6,4-7,8	10-20
7	(TES) N-трис[гидроксиметил]-метил-2-аминоэтаносульфоновая кислота	229,2	7,5	6,8-8,2	10-20
8	(TAPSO) 3[N-трис (гидроксиметан) метиламино]-2-гидроксипропаносульфоновая кислота	259,3	7,6	7,0-8,2	4-50
9	(POPSO) Пиперазин N, N-бис (2-гидроксипропано) сульфоновая кислота	398,4	7,8	7,2-8,5	10-20
10	(TRIZMA BASE) Трис-(гидроксиметил) аминметан	121,1	8,1	7,0-9,0	10-20
11	(TAPS) N-трис (гидроксиметил) метил-3-аминопропаносульфоновая кислота	243,3	8,4	7,7-9,1	4-50
12	Глицин (0,1 M)	75,0	9,23	9,0-11,0	50-200
13	Глицилглицин	252,3	7,59	7,5-8,9	10-20

Базовая среда Игла (БСИ) и ее модификации

Компоненты	Модификация среды (г/л)			
	БСИ на растворе Эрла (с хелесом)	БСИ на растворе Хенкса (с хелесом)	Для диплоидных клеток	Для автоклавирования
<i>Соли и кислоты</i>				
Кальция хлорид x 2H ₂ O	0,265	0,185	0,265	0,265
Магния хлорид x 6H ₂ O	-	-	0,2	-
Калия хлорид	0,4	0,4	0,4	0,4
Магния сульфат	0,009767	0,009767	-	0,009767
Калия монофосфат	-	0,060	-	-
Натрия хлорид	6,8	8,0 (7,2)	6,8	6,8
Натрия бикарбонат	2,2	0,35	2,2	2,2
Натрия бифосфат	0,122	-	0,122	0,122
Натрия монофосфат	-	0,04788	-	-
Натрия сукцинат x 6H ₂ O	-	-	-	0,1
Янтарная кислота	-	-	-	0,075
Хелес	(5,958)	(5,958)	-	-
<i>Аминокислоты</i>				
L-аргинин x HCl	0,021	0,021	0,021	0,021
L-цистенн x HCl	0,01565	0,01565	0,01565	0,01565
L-глутамин	0,292	0,292	0,292	-
L-гистидин	0,008	0,008	0,008	0,008
L-изолейцин	0,026	0,026	0,026	0,026
L-лейцин	0,026	0,026	0,026	0,026
L-лизин x HCl	0,03647	0,03647	0,03647	0,03647
L-метионин	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075

L-фенилаланин	0,0165	0,0165	0,0165	0,0165
L-тиронин	0,024	0,024	0,024	0,024
L-тирозин	-	-	-	0,0018
L-триптофан	0,004	0,004	0,004	0,004
L-тирозин x 2Na x 2H ₂ O	0,02595	0,02595	0,02595	-
L-валин	0,0235	0,0235	0,0235	0,0235
<i>Витамины</i>				
D-биотин	0,001	0,001	0,001	0,001
Холин битартрат	-	-	-	0,0018
Холин хлорид	0,001	0,001	0,001	-
Фолиевая кислота	0,001	0,001	0,001	0,001
Миоинозитол	0,002	0,002	0,002	0,002
Никотинамид	0,001	0,001	0,001	0,001
D-пантотеновая кислота	0,001	0,001	0,001	0,001
Пиридоксаль x HCl	0,001	0,001	0,001	0,001
Рибофлавин	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Тиаминхлорид	0,001	0,001	0,001	0,001
<i>Добавочные ингредиенты</i>				
D-глюкоза	1,0	1,0	1,0	1,0
Феноловый красный	0,011	0,011	0,011	0,011
<i>Параметры среды</i>				
pH при 25 ⁰ C без NaHCO ₃	5,9±0,3. (5,5±0,3)	6,8±0,3	5,9 ±0,3	4,2±0,3
pH при 25 ⁰ C с NaHCO ₃	7,7±0,3 (6,9±0,3)	7,4±0,3	7,6±0,3	7,3±0,3
Осмолярность (МО см/кг H ₂ O с NaHCO ₃)	300±5% (285±5%)	290±5%	285±5%	295±5%
Количество сухой среды	9,2 (14,4)	10,3	9,3	9,1

**Количество отдельных компонентов (мл),
входящих в состав 1 л базовой среды Игла (БСИ)**

№	Раствор, вещество	БСИ на растворе Эрла	БСИ на растворе Хенкса
1	10 ^x солевой раствор Эрла	100	-
2	10 ^x солевой раствор Хенкса	-	100
3	100 ^x раствор аминокислот БСИ	10	10
4	100 ^x раствор незаменимых аминокислот БСИ	10	10
5	100 ^x раствор витаминов БСИ	10	10
6	100 ^x раствор L-глутаминна (200 ммоль/л)	10	10
7	7,5% раствор бикарбоната натрия	29,3	4,7
8	Вода	до 1 л	до 1л

Состав культуральных сред α -MEM, D-MEM, DI-MEM, Хэмса F-10, Хэмса F-12, F-12
в модификации Кунса (г/л)

Компоненты	α -MEM	DI-MEM с L- глутамином и 25 мМ хелесом	DI-MEM с NaHCO_3 и 25 мМ хелесом	D-MEM	Хэмса F-10 с L-глута- мином и хелес	Хэмса F-12 с L- глутамином и хелес	Хэмса F-12 в моди- фикации Кунса
Кальция хлорид $\times \text{H}_2\text{O}$	0,265	0,219	0,219	0,265	0,0441	0,0441	0,165
Сульфат меди $\times \text{H}_2\text{O}$	0,09767	0,09767	0,09767	-	$0,25 \times 10^{-5}$	$0,25 \times 10^{-5}$	$0,25 \times 10^{-5}$
Нитрат железа $\times 9 \text{H}_2\text{O}$	-	-	-	0,0001	$8,34 \times 10^{-4}$	$8,34 \times 10^{-4}$	$8,34 \times 10^{-7}$
Хлорид магния $\times \text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	0,123	0,09963
Магния сульфат	0,09767	-	-	0,09767	0,07464	-	0,02528
Калия хлорид	0,4	0,33	0,33	0,4	0,285	0,224	0,305
Натрия бикарбонат	-	-	3,024	-	-	-	-
Натрия хлорид	6,8	4,505	4,505	6,4	7,4(6,8)	7,599(7,1)	7,517
Натрия бифосфат	-	-	-	-	-	-	0,1324
Натрия монофосфат	0,122	0,109	0,109	0,109	0,1531	0,104	-
Цинка сульфат $\times 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	$2,88 \times 10^{-4}$	$8,63 \times 10^{-5}$	$8,63 \times 10^{-5}$

Натрия селенит	-	$0,173 \times 10^{-4}$	$0,173 \times 10^{-4}$	-	-	-	-
Хелес	-	5,958	5,958	-	(5,958)	(5,958)	-
<i>АМИНОКИСЛОТЫ</i>							
L-аланин	0,025	0,025	0,025	-	0,009	0,009	0,018
L-аргинин х НСl	0,12664	0,084	0,084	0,084	0,211	0,211	0,422
L-аспарагин х Н ₂ О	0,050	0,0284	0,0284	-	0,01501	0,01501	0,03
L-аспаргатовая кислота	0,03	0,03	0,03	-	0,0133	0,0133	0,026
L-цистеин х НСl х Н ₂ О	0,1	-	-	-	0,035	0,035	0,07026
L-цистин х 2НСl	0,3128	0,09124	0,09124	0,0626	-	-	-
L-глутаминовая кислота	0,075	0,075	0,075	-	0,0147	0,0147	0,3
L-глутамин	0,292	0,584	-	0,584	0,146	0,146	0,292
Глицин	0,05	0,03	0,03	0,03	0,00751	0,00751	0,016
L-гистидин х НСl х Н ₂ О	0,042	0,042	0,042	0,042	0,023	0,2096	0,042
L-изолейцин	0,0525	0,105	0,105	0,105	0,0026	0,00394	0,0078
L-лейцин	0,0524	0,105	0,105	0,105	0,0131	0,00131	0,0262
L-лизин х НСl	0,0725	0,146	0,146	0,146	0,0293	0,0365	0,073
L-метионин	0,015	0,03	0,03	0,03	0,0293	0,0365	0,009
L-фенилаланин	0,032	0,066	0,066	0,066	0,00496	0,00496	0,01
L-пролин	0,04	0,04	0,04	-	0,0115	0,0345	0,07
L-серин	0,025	0,042	0,042	0,042	0,0105	0,0105	0,021
L-треонин	0,048	0,095	0,095	0,095	0,00357	0,0199	0,0238
L-триптофан	0,01	0,016	0,016	0,016	0,0006	0,00204	0,004

L-тирозин х 2Na2H ₂ O	-	0,10379	0,10379	0,10379	0,00261	0,00778	0,01586
L-валин	0,046	0,094	0,094	0,094	0,0035	0,0117	0,0234
<i>Витамины</i>							
L-аскорбиновая кислота	0,05	-	-	-	-	-	0,015
D-биотин	0,0001	0,000013	0,000013	-	$2,4 \times 10^{-5}$	$0,73 \times 10^{-5}$	$0,73 \times 10^{-5}$
Холинхлорид	0,001	0,004	0,004	0,004	$6,98 \times 10^{-4}$	$13,96 \times 10^{-4}$	$13,96 \times 10^{-4}$
Фолиевая кислота	0,001	0,004	0,004	0,004	$5,41 \times 10^{-4}$	0,00132	0,00132
Миоинозитол	0,002	0,0072	0,0072	0,0072	0,00541	0,018	0,01802
Никатинамид	0,001	0,004	0,004	0,004	$6,15 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-5}$	0,00004
D-пантотеновая кислота	0,001	0,004	0,004	0,004	$7,15 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$	0,000238
Природосальгидрохлоридпиродоксин х HCl	-	-	-	-	$2,06 \times 10^{-4}$	$6,2 \times 10^{-5}$	6×10^{-5}
Рибофлавин	0,0001	0,0004	0,0004	0,0004	$3,76 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-5}$	4×10^{-4}
Витамин B ₁₂	0,00136	0,000013	0,000013	-	0,00136	0,00136	0,00136
Триамингидрохлорид	0,001	0,004	0,004	-	0,001	0,00034	$3,37 \times 10^{-4}$
<i>Другие компоненты</i>							
Аденозин	0,01	-	-	-	-	-	-
Цитидин	0,01	-	-	-	-	-	-
2-Деоксиаденозин	0,01	-	-	-	-	-	-
2-Деоксицитидин	0,01	-	-	-	-	-	-
2-Деоксигуанозин	0,01	-	-	-	-	-	-
D-глюкоза	1,0	4,5	4,5	4,5	1,1	1,8	1,802

Гуанозин	0,01	-	-	-	-	-	-
Хлорид	-	5,958	5,958	-	-(5,958)	-(5,958)	-
Феноловый красный	0,011	0,016	0,016	0,0159	0,0013	0,0013	0,00125
Натрия пируват	0,11	0,11	0,11	-	0,11	0,11	0,22
Тиоктиковая кислота	0,0002	-	-	-	-	-	0,000206
Тимидин	0,01	-	-	-	-	-	0,0007
Уридин	0,01	-	-	-	-	-	-
NaHCO ₃	2,2	3,024	-	-	1,2	1,176	2,676
L-глутамин	-	-	0,584	3,7	-	-	-
Гипоксантин	-	-	-	-	0,00408	0,00408	0,00408
Линолевая кислота	-	-	-	-	-	0,84 x 10 ⁻⁴	9 x 10 ⁻⁵
Путресцин x HCl	-	-	-	-	-	1,61 x 10 ⁻⁴	1,61 x 10 ⁻⁴
<i>Параметры среды</i>							
pH при 25°C NaHCO ₃	7,2±0,3	7,0±0,3	7,2±0,2	7,2±0,2	7,4±0,3 (6,6±0,3)	7,7±0,3 (6,7±0,3)	7,5±0,3
Осмолярность с NaHCO ₃ (мО см/кг)	299±5%	276±5%	276±5%	305±5%	285±5% (276±5%)	291±5% (300±5%)	334±5%
Количество сухой среды	10,1	17,7	—	9,6	9,8(15,2)	10,7(16,2)	11,6

**Состав сред Фишера, Лейбовица L-15,
Фиттон-Джексона, Амеса (г/л)**

Компоненты	Среды			
	Фишера	Лейбовица L-15 (с L-глутамином)	Амеса	Фиттон-Джексона
<i>Соли и кислоты</i>				
Хлорид кальция x 2H ₂ O	0,091	0,185	0,169	-
Магния хлорид x 6H ₂ O	0,1	0,2	-	-
Натрия ацетат	-	-	-	0,05
Калия хлорид	0,4	0,4	2,231	0,4
Калия монофосфат	-	0,06	0,068	-
Натрия хлорид	8,0	8,0	7,01	6,8
Натрия бифосфат	0,06	0,190	-	0,112
Натрия монофосфат	0,06	-	-	0,02434
Магния сульфат	-	0,09767	-	0,09768
<i>Аминокислоты</i>				
L-аланин	-	-	0,0024	0,250
D-аланин	-	0,45	-	-
L-аргинин	-	0,5	-	0,175
L аргинин x HCl	0,015	-	0,00421	-
L-аспарагин	0,01	0,25	0,00084	-
L-аспарагиновая кислота	-	-	0,00012	0,150
L- цистеин	-	0,125	-	-
L-цистеин x HCl	0,081	-	0,000065	0,1003
L-глутамин	0,204	0,3	0,073	0,2
L-глицин	-	0,2	0,00045	0,8
L-гистидин	-	0,25	-	0,15
L-гистидин x HCl x H ₂ O	0,081	-	0,002513	-
L-изолейцин	-	0,25	-	-
L-лейцин	0,03	0,125	0,00144	0,050
L-лизин	-	0,075	-	-
L-лизин x HCl	0,05	-	0,003648	0,240

Таурин	-	-	0,00075	-
DL-метионин	-	0,125	-	-
L-метионин	0,1	-	0,00039	-
DL-фенилаланин	-	0,25	-	-
L-фенилаланин	0,06	-	0,00132	0,05
L-серин	0,015	0,2	0,00252	0,2
L-пролин	-	-	0,00007	0,4
DL-треонин	-	0,6	-	-
L-треонин	0,04	-	0,00333	0,075
L-триптофан	0,01	0,02	0,00049	0,04
L-тирозин	-	0,3	-	-
L-тирозин x 2Na x 2H ₂ O	0,08716	-	0,00211	0,05765
DL-валин	-	0,2	-	0,065
L-валин	0,07	-	0,00176	-
<i>Витамины</i>				
D-биотин	0,00001	-	0,0001	0,0002
Холин хлорид	0,0015	0,001	0,0007	-
Аскорбиновая кислота	-	-	0,01796	0,05
Натрия флави- мононуклеотид	-	0,0001	-	-
Холин битартрат	-	-	-	0,0907
Фолиевая кислота	0,01	0,001	0,0001	0,0002
Миоинозитол	0,0015	0,002	0,0272	0,0002
Никатинамид	0,0005	0,001	0,0001	0,02
Кальциевая соль D-пантотеновой кислоты	0,0005	0,001	0,0001	0,0002
Пиридоксаль 5-фосфат	-	-	0,0001	0,0002
Гидрохлорид пиридоксина	-	-	0,0001	-
Гидрохлорид пиридоксала	0,0005	-	0,0001	-
Рибофлавин	0,0005	-	0,00001	0,0002
Тиамин x HCl	0,001	-	0,0001	0,004
Витамин B ₁₂	-	-	-	0,00004
РАВА	-	-	-	0,02
Динатриевая соль токоферола фос- фата	-	-	-	0,01
<i>Другие компоненты</i>				
D-галактоза	-	0,9	-	-
Гипоксантин	-	-	0,00082	0,02
Феноловый красный	0,0053	0,011	-	-
D-глюкоза	1,0	-	1,081	10,0
Натрия пируват	-	0,55	0,01333	-

Натрия бикарбонат	1,125	-	1,932	3,5
L-глутамин	-	-	-	-
Кальция лактат	-	-	-	0,56
Цитидин	-	-	0,00073	-
Тимидин	-	-	0,00024	-
Уридин	-	-	0,00073	-
<i>Параметры среды</i>				
РН при 25°C (с натрием бикарбонатом)	7,7±0,3	8,1±0,3	7,7±0,3	7,4±0,3
Осмолярность (с натрием бикарбонатом) (мОм см/кг)	300±5%	320±5%	280±5%	399±5%
Количество сухой среды	10,6	14,8	8,9	21,3

Приложение 10

**Среды с низким содержанием белков
и бессывороточные среды для культивирования
нетрансформированных диплоидных клеток млекопитающих
и некоторых клеточных линий (Freshney, 1994, с дополнениями)**

Тип клеток	Среда	Дополнительные компоненты
Фибробласты человека	MCDB-110	инсулин – 0,95 мкг/мл, ФРЭп – 30 нг/мл, дексаметазон – $0,14 \times 10^{-6}$ М, ПГЕт – $2,5 \times 10^{-8}$ М, ПГЕР _{2a} – 2×10^{-6} М, глутатион – $6,5 \times 10^{-7}$ М, фосфоэнолпируват – 1×10^{-5} М, липосомы В – 10 мкл/мл, лецитин бобов сои – 6 нг/мл, холестерин – 3 мкг/мл, сфингомиелин – 1 мкг/мл, витамин Е – 0,06 мкг/мл, витамин Е-ацетат – 0,2 мкг/мл
Фибробласты кур	MCDB-202	инсулин – 20 мкг/мл, ФРЭп – 20 нг/мл, липосомы В – 10 мкл/мл (см. выше)
Фибробласты овец	MCDB-202	инсулин – 10 мкг/мл, дексаметазон – 10^{-6} М, липосомы В – 30 мкл/мл (см. выше)
Диплоидные Фибробласты человека (MRC-5)	D-MEM/199 (1:1)	инсулин – 1 мкг/мл, трансферрин – 25 мкг/мл, селенит – 15×10^{-9} М, ФРЭп 10 нг/мл, дексаметазон 50 нг/мл, путресцин – 1×10^{-10} М, фибронектин – 2 мкг/мл (для обработки стенок культуральной посуды), БСА – 2 мг/мл, фетуин – 1 мг/мл, молибдат 5×10^{-10} М, хепес – $1,0 \times 10^{-2}$

Фибробласты легких человека (линия WIT-38)	MCDB-104 (MCDB-105C хелесом и бикарбонатами)	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, р-ФРЭн – 0,03–0,5 нг/мл, дексаметазон – 55 нг/мл, фибронектин – 5 мкг/мл (для обработки культуральной посуды), фактор роста тромбоцитов – 1 мкг/мл, 2% ЭТС
Кератиноциты человека	MCDB-104 (или MCDB-151/ MCDB-1041:1)	инсулин – 5 мкг/мл, р-ФРЭн – 0,03–0,5 нг/мл, гидрокортизон – $1,4 \times 10^{-6}$ М, этаноламин – 5×10^{-4} М, фосфазаноламин – 1×10^{-4} М, гепарин – 4×10^{-6} М, трансферрин – 5 мкг/мл
Бронхоэпителиальные клетки человека	MCDB-152	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 10 мкг/мл, ФРЭп – 5 нг/мл, гидрокортизон – $0,5 \times 10^{-6}$ М, этаноламин – 5×10^{-4} М, фосфазаноламин – 5×10^{-4} М
Клетки эпителия молочной железы человека	MCDB-170	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, ФРЭп – 25 нг/мл, гидрокортизон – $1,4 \times 10^{-6}$ М, этаноламин – 1×10^{-4} М, фосфазаноламин – 1×10^{-4} М
Хондроциты кролика	MCDB-104	инсулин – 1 мкг/мл, ФРЭп – 100 нг/мл, липосомы В – 5 мкг/мл
Хондроциты суставов кролика	F-12	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, ФРЭп 4,0 нг/мл, ФРФ – 100 нг/мл, дексаметазон 20 нг/мл, фибронектин – 2 мкг/мл (для обработки посуды), БСА – 1,0 мг/мл, соматотропин – 10 мкг/мл, тромбин 1 мкг/мл, АСР (активность, стимулирующая размножение) – 0,05 мкг
Клетки предстательной железы человека	RPMI-1640	инсулин – 12 мкг/мл, трансферрин – 1 мкг/мл, ФРЭп – 10 нг/мл, дексаметазон – $0,01 \times 10^{-6}$ М, хлорид цинка – 1×10^{-8} М
Линия клеток тестикулярного эпителия мыши (ТМ 4)	D-MEM/F-12 (1:1)	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин 5 мкг/мл, ФРЭп 3 нг/мл, фолликуло-стимулирующий гормон – 0,5 мкг/мл, соматомедин С – 1 нг/мл, соматомедин овцы – 6,5 мкЕд/мл, ретиноиновая кислота – 50 мкг/мл
Нейроны	D-MEM/F-12 (1:1)	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 100 мкг/мл, селенит 30×10^{-9} , дексаметазон 10^{-6} М, путресцин 2×10^{-4} , фибронектин – 100 мкг/мл – покрытие для адгезии клеток, глутамин $3,9 \times 10^{-6}$, ФРН 10 Ед/мл
Астроциты мыши	0-MEM (на растворе Эрла)	инсулин – 10 мкг/мл, трансферрин – 100 мкг/мл, селенит – 10^{-9} , ФРЭп – 10 нМ, Фн – для покрытия посуды – 1 мкг/мл, гиалуроновая кислота – 10 мкг/мл, ингибитор трипсина – 1 мкг/мл, глюкоза – 0,25%, глутамин – 2×10^{-6}

Клетки мозга эмбриона крысы	D-MEM	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 1 мкг/мл, дексаметазон – 2×10^{-8} , ФРН – 5 мкг/мл, витамин В – 1,4 мкг/мл, биотин – 1 мкг/мл, D-, L- α -токоферол – 10 мкг/мл, ретинол – 5 мкг/мл, холин, карнитин, линолевая кислота, липоевая кислота, микроэлементы
Клетки гипофиза крысы	D-MEM/F-12(1:1)	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, селенит – 50×10^{-9} , ФРЭп – 40 нг/мл, ФРФ – 10 нг/мл, трийодтиронин – $0,5 \times 10^{-9}$, путресцин – 2×10^{-4} , тиролиберин – 1 нг/мл, люлиберин – 4 нг/мл, ПГЕ – 100 нг/мл
Клетки гипоталамуса крысы	D-MEM/F-12(1:1)	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 100 мкг/мл, гидрокортизон – 8 нг/мл, трийодтиронин – $0,03 \times 10^{-9}$, путресцин – 10^{-4} , тироглобулин – 100 мкг/мл
Гепатоциты	F-12	инсулин – 0,06 мкг/мл, дексаметазон – $0,01 \times 10^{-6}$, 0,2% БСА, глюкагон – 10^{-4} М, хепес – 10^{-2} М, фетуин – 1 мг/мл, стенки культуральной посуды покрыты коллагеном или Фн
Кардиомиоциты крысы	D-MEM/F-12(1:1)	инсулин – 26 мкг/мл, трансферрин – 25 мкг/мл, гидрокортизон – $0,1 \times 10^{-6}$, этаноламин – 2 мкг/мл
Адипоциты мыши (из макрофагов)	D-MEM	инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, селенит – 10^{-9} М, глюкоза – 4,5 г/л, пируват – 10^{-9} М, NaHCO_3 – 3,7 мг/л, линолевая кислота, супернатант L-клеток – 30%
Меланоциты	MCDB-151/MCDB-104 (1:1) с хепесом и бикарбонатом	гидрокортизон – 0,004–5 мкг/мл, бычий инсулин – 0,001–20 мкг/мл, гепарин – 0,1–10 мкг/мл, форболмиристат ацетат – 1–5 нг/мл, трансферрин – 0,5–100 мкг/мл, рТФР 0,9–7 нг/мл
Линии MOLT-4, DY-1, JURKAT, WENI, K-562, COS, RAJI, NIH, HL-60, M LA-144, NAMAWA	DI-MEM с хепес-буфером	инсулин – 5 мкг/мл, 0,5% БСА, трансферрин – 5,5 мкг/мл
Гибридомы и линии клеток: SP2/D-AG-14, NS-5-1	DI-MEM с хепес-буфером	инсулин – 5 мкг/мл, 0,8% БСА, трансферрин – 5,5 мкг/мл, холестерол

Бласты крови и линии клеток: SP2/D-AG-14, SP2 SA3, SP2MA1, SP2SS1.SP2S A5, U 937	DI-MEM с хепес-буфером	инсулин – 10 мкг/мл, 2% БСА, трансферрин – 5,5 мкг/мл, холестерол
--	------------------------	---

Приложение 11

Фиксация, хранение и сроки доставки материала для гистологического исследования

Вид исследования	Фиксирующий агент	Хранение	Срок
Паноптическое гистологическое	10% формальдегид, забуференный при pH 7,4	при комнатной температуре	не ограничен
Гистохимическое	в зависимости от задач исследования по согласованию с сотрудниками отдела	в зависимости от вида фиксирующего агента	в зависимости от вида фиксирующего агента
Иммуногистохимическое	заморозка	морозильная камера	1 час
Электронно-микроскопическое	4% параформальдегид, забуференный при pH 7,4-8,0	холодильник	1 сутки
Паноптическое цитологическое	высушивание	холодильник	1 час
Цитохимическое, в том числе иммуноцитохимическое	в зависимости от задач исследования по согласованию с сотрудниками отдела	в зависимости от вида фиксирующего агента	в зависимости от вида фиксирующего агента
Цитогенетическое	в зависимости от вида материала и задач исследования, производится сотрудником отдела	в зависимости от вида фиксирующего агента	в зависимости от вида фиксирующего агента

Рекомендуемый объем биопсирования

Объект исследования	Минимально необходимое количество объектов
Опухоли полостных органов (эндоскопические биопсии)	
Центральная зона опухоли	1-2
Периферическая зона опухоли	4-5
Граница опухоли и неизменной слизистой оболочки	3-4
Слизистая оболочка вблизи опухоли (на расстоянии 1-2 см)	2-3
Слизистая оболочка вне зоны опухолевого роста	2-3
Опухоли паренхиматозных органов (пункционные биопсии)	2-3
Центральная зона опухоли (узла)	2-3
Периферическая зона опухоли (узла)	2-3
Диффузные поражения паренхиматозных органов (пункционные биопсии)	2-3
Участки наибольших изменений	2-3
Участки наименьших изменений	2-3
Воспалительные, дистрофические поражения полостных органов, остаточные явления патологических процессов (эндоскопические биопсии)	2-3
Макроскопически определяемые изменения слизистой оболочки (из каждого участка)	2-3
Внешне не измененные участки слизистой оболочки	4-6

**НАПРАВЛЕНИЕ
НА ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ (ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ) ИССЛЕДОВАНИЕ
форма 014/у**

Фамилия, имя, отчество пациента _____
Число, месяц, год рождения _____ Пол _____
Вид оплаты _____
Учреждение _____ Отделение _____
Вид исследования _____
Дата _____ Номер протокола _____
Краткая характеристика макроскопической картины _____

Вид биопсии _____
Реквизиты и результаты предыдущих биопсийных исследований: _____

Маркировка материала и количество объектов	Эндоскопическое заключение
1 _____	_____
2 _____	_____
3 _____	_____
4 _____	_____
5 _____	_____

Врач (фамилия, инициалы) _____
Медсестра (фамилия, инициалы) _____

Подпись _____
Подпись _____

**ВЕДУЩИЕ ФИРМЫ, ПРЕДЛАГАЮЩИЕ
ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ
И РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ,
НА РОССИЙСКОМ РЫНКЕ**

ЗАО «Ретинонды»

Используя классические методы изготовления гистологических препаратов и новейшее микроскопическое оборудование, ЗАО «Ретинонды», единственное в нашей стране, на базе кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии (заведующий – профессор В.И. Ноздрин) медицинского института Орловского государственного университета предпринимает усилия по массовому изготовлению учебных гистологических препаратов, которые были продемонстрированы участникам Всероссийской научной конференции «Гистологическая наука России в начале XXI века: итоги, задачи, перспективы (Москва, октябрь 2003 г.), а также ежегодных научных конференциях «Бабухинские чтения» в г. Орле (2003, 2004, 2005, 2006 гг.) и получили их одобрение.

В настоящее время предлагаются:

1. Почка крысы. Окраска гематоксилин-эозином.
2. Яичник кошки. Окраска гематоксилин-эозином.
3. Селезенка крысы. Окраска гематоксилин-эозином.
4. Селезенка крысы. Коллоидный уголь в макрофагах. Окраска гематоксилин-эозином.
5. Печень крысы. Коллоидный уголь в макрофагах. Окраска гематоксилин-эозином.
6. Сальник крысы. Коллоидный уголь в макрофагах. Окраска гематоксилин-эозином.
7. Мочевой пузырь кошки. Окраска гематоксилин-эозином.
8. Мышца как орган. Окраска по Ван-Гизону.
9. Надпочечник крысы. Окраска гематоксилин-эозином.
10. Трахея собаки. Окраска гематоксилин-эозином.
11. Кожа пальца человека. Окраска гематоксилин-эозином.
12. Роговица глаза собаки. Окраска гематоксилин-эозином.
13. Язык кролика. Окраска гематоксилин-эозином.
14. Семенник крысы. Окраска гематоксилин-эозином.
15. Эластическая хрящевая ткань. Надгортанник собаки. Окраска гематоксилин-эозином.
16. Эластическая хрящевая ткань. Ушная раковина свиньи. Окраска гематоксилин-эозином.
17. Печень свиньи. Окраска гематоксилин-эозином.
18. Печень свиньи. Окраска по Ван-Гизону.
19. Мазок крови человека. Окраска по Романовскому-Гимза.
20. Миокард свиньи. Окраска гематоксилин-эозином.
21. Червеобразный отросток человека. Окраска гематоксилин-эозином.

22. Сухожилие свиньи (продольный срез). Окраска гематоксилин-эозином.
23. Тимус щенка. Окраска гематоксилин-эозином.
24. Кубический эпителий канальцев почки кролика. Окраска гематоксилин-эозином.
25. Легкое крысы. Окраска гематоксилин-эозином.
26. Гиалиновый хрящ. Ребро собаки. Окраска гематоксилин-эозином.
27. Поджелудочная железа кошки. Окраска гематоксилин-эозином.
28. Сосудисто-нервный пучок. Окраска гематоксилин-эозином.
29. Нелактирующая молочная железа. Окраска гематоксилин-эозином.
30. Простата собаки. Окраска гематоксилин-эозином.
31. Матка человека. Окраска гематоксилин-эозином.
32. Яйцевод человека. Окраска гематоксилин-эозином.
33. Селезенка кошки. Окраска гематоксилин-эозином.
34. Пуловина человека. Окраска гематоксилин-эозином.
35. Пуловина человека. Плодная часть. Окраска гематоксилин-эозином.
36. Плацента человека. Плодная часть. Окраска гематоксилин-эозином.
37. Плацента человека. Материнская часть. Окраска гематоксилин-эозином.
38. Желтое тело. Яичник кошки. Окраска гематоксилин-эозином.
39. Тонкая кишка и поджелудочная железа крысы. Окраска гематоксилин-эозином.
40. Аорта кошки. Окраска гематоксилин-эозином.

Стоимость одного препарата с НДС без пересылки – 58 руб. Гарантийные письма направлять по адресу: 111123, Москва 123, а/я 52, ЗАО «Ретиноиды» или по E-mail: retinoids@yandex.ru.

Справки о препаратах можно получить по адресу: 302028, г. Орел, ул. Октябрьская 25, медицинский институт Орловского госуниверситета, кафедра биологии и гистологии. Тел./факс: (0862) 43-07-09. E-mail: orelhistet@orl.ru или orelscientist@fromru.com.

ООО «Карл Цейс»

Москва, Денисовский пер., 26.

Новосибирское представительство: 630090, Новосибирск, ул. М. Джалиля, 11, офис 730, тел.: 095-933-51-51, факс.: 095-933-51-55.

ООО «Карл Цейс» занимается распространением на российском рынке гистологического оборудования и расходных материалов, обучает персонал, работающий на гистологической технике, занимается популяризацией новейших гистологических методов.

Leica Microsystems (представительство в СНГ)

107140, Москва, 1-й Красносельский пер., д.7.9, строение 4, этаж 2; тел.: (095) 264-81-74, 264-16-83, 264-81-83, факс.: (095) 975-20-07.

Leica Microsystems предлагает точную механику и оптику для операционной микроскопии, лабораторной микроскопии и гистологической техники.

ООО «Компания БиоВитрум»

199155, Санкт-Петербург, а/я 25; тел.: (812)305-06-06 (многоканальный)
тел/факс.: (812) 321-42-81.

ООО «Компания БиоВитрум» предлагает широкий спектр лабораторного оборудования и расходных материалов российского и зарубежного производства в том числе: микроскопы и любые комплектующие к ним, комплекты для фото- и видеодокументирования, программные комплексы для обработки данных, комплексы стереомикроскопов.

ООО «ДиаМорф»

125009, Москва-9, а/я 358, тел./факс: (095) 202-55-50, 742-08-06.

ООО «ДиаМорф» предлагает комплексы для автоматизации клинико-морфологический обследований с возможностью удаленных консультаций, статистической обработки результатов анализа.

ООО Компания «БиоЛайн»

194044, Санкт-Петербург, Пироговская наб., д.21.

Бизнес-центр «Нобель», тел.: (812) 320-49-49, факс: (812) 320-49-40

ООО Компания «БиоЛайн» является эксклюзивным представителем фирмы Novocastra Lab, предлагает комплекты для проведения иммуногистохимических исследований, антитела, сопровождая их подробными рекомендациями к использованию.

НПФ «Абрис»

196143 Санкт-Петербург, пр. Гагарина, 65, тел.:(812) 126-49-39, 127-24-40,
тел./факс: (812) 126-85-02, 327-64-75.

НПФ «Абрис» предлагает оборудование и красители для гематологических исследований.

ООО «ГЕМ»

125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4-а, тел.: (095): 787-04-32
тел/факс.: (095) 212-43-12, 212-40-80.

ООО «ГЕМ» предлагает современные и безопасные средства отбора материала для цитологического исследования, средства индивидуальной защиты.

Дополнительная литература

1. Абрамов М.Г. Клиническая цитология. – М.: Медицина, 1974. – 334 с.
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
3. Автандилов Г.Г. Морфометрия в патологии. – М.: Медицина, 1973. – 224 с.
4. Агеев А.К. Гистохимия щелочной и кислой фосфатаз человека в норме и патологии. – Л.: Медицина, 1969. – 120 с.
5. Артишевский А.А., Леонтьук А.С., Слука Б.А. Гистология с техникой гистологических исследований. – Минск: Высшая школа, 1999. – 236 с.
6. Бабанин А.А., Колбасин Л.Н., Ромаскевич Ю.А. Современное состояние морфометрических исследований в медицине (обзор) // Деп. в ВИНТИ 08.12.88, № 8683–В88. Крымский медицинский институт. – Симферополь, 1988.
7. Безнушенко Г.В., Сесорова И.С., Миронов А.А. Как измерять структуры, или новая стереология: 1. Способы отбора и ориентации образцов // Морфология. – 2005. – № 5. – С.72–75.
8. Безнушенко Г.В., Сесорова И.С., Миронов А.А. Как измерять структуры, или новая стереология: 2. Методы определения абсолютных размеров клеточных структур при световой микроскопии // Морфология. – 2005. – № 6. – С.63–66.
9. Белицкая Е.Я. /Ред. Учебное пособие по медицинской статистике. – Л.: Медицина, 1972. – 175 с.
10. Берстон М. Гистохимия ферментов. – М.: Мир, 1965. – 464 с.
11. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. – М., 1976. – 71 с.
12. Буданцев А.Ю., Айвазян А.Р. Компьютерная 3-мерная реконструкция биологических объектов с использованием серийных срезов // Морфология. – 2005. – № 1. – С. 72-78.
13. Бухвалов И.П. Гистохимия.: Учебное пособие. – М.: Высшая школа, 1993. – 271 с.

14. Гайер Г. Электронная гистохимия. Пер. с нем. – М.: Мир, 1974. – 448 с.
15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
16. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1992. – 264 с.
17. Горчаков В.Н. Морфологические методы исследования сосудистого русла. – Новосибирск: Изд-во СО РАМН, 1997. – 440 с.
18. Гуцол А.А., Кондратьев Б.Ю. Практическая морфометрия органов и тканей: Для врачей-патологоанатомов. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1988. – 136 с.
19. Епифанова О.И. Радиоавтография.: Учебное пособие для студентов биологических специальностей вузов. – М.: Высшая школа, 1987. – 246 с.
20. Епифанова О.И., Терских В.В., Захаров А.Ф. Радиоавтография. – М.: Высшая школа, 1977. – 246 с.
21. Жаров А.В. Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях (диагностика, исследование сырья и продукции): Методическое руководство. – М.: Московская академия ветеринарной медицины и биотехнологии, 2003. – 71 с.
22. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. и др. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Киев: Вища школа, 1983. – 383 с.
23. Иммунологические методы / Под ред. Г.Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 224 с.
24. Иммунология: Словарь. Пер. с англ К. Дреслер. – Киев: Вища школа, 1988. – 224 с.
25. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. – Будапешт, 1962. – 399 с.
26. Козловская Л.В., Николаев А.Ю. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. –2-е изд.– М.: Медицина, 1984. – 288 с.
27. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Зинькова Н.Н., Григорьев И.П., Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление

нейронов головного мозга с помощью селективного маркера Neu N // Морфология. – 2005. – № 5. – С. 76–78.

28. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление катехоламинергических структур в парафиновых срезах головного мозга крысы после различных способов фиксации // Морфология. – 2005. – № 1. – С. 63–64.

29. Крстич Р.В. Иллюстрированная энциклопедия по гистологии человека. – СПб: СОТИС, 2001. – 536 с.

30. Культура животных клеток. Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 312 с.

31. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

32. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 645 с.

33. Лурия Е.А. Кровотворная и лимфоидная ткань в культурах. – М.: Медицина, 1972. – 176 с.

34. Меркулов Г.А. Курс патологической техники. – Л., Медицина, 1969. – 423 с.

35. Методы культивирования. – Л.: Наука, 1987. – 322 с.

36. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Петрова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

37. Пиз Д. Гистологическая техника в электронной микроскопии. – М.: Иностранная лит-ра, 1963. – 164 с.

38. Полак Д., Норден С.В. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. – М.: Мир, 1987. – 74 с.

39. Принципы и методы гистологического анализа в патологии / Под ред. А.П. Авцина, А.И. Струкова, Б.Б. Фукса. – М.: Медицина, 1971. – 368 с.

40. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 305 с.

41. Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Иностранная лит-ра, 1953. – 718 с.

42. Семченко В.В., Барашкова С.А., Артемьев В.Н. Гистологическая техника: учебное пособие. – 2-е изд., стереотип. – Омск: Омская медицинская академия, 2003. – 152 с.
43. Славин М.Б. Методы системного анализа в медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1989. – 303 с.
44. Уикли Б., Электронная микроскопия для начинающих. Пер. с англ. – М.: Мир, 1975. – 324с.
45. Фрайштат Д.М. Реактивы и препараты для микроскопии: Справочник. – М.: Химия, 1980. – 479 с.
46. Хейхоу Ф.Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.
47. Хруст Ю.Р., Литинская Л.Л., Оглобика Т.А. Основы количественной цитохимии. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1978. – 226 с.
48. Цитология ферментов. Пер. с англ./ Под ред. А.А. Покртвенго. – М.: Мир, 1971. – 397 с.
49. Шабадаш А.Л. Рациональная методика химического обнаружения гликогена и ее теоретическое обоснование // Изв. АН СССР, 1947. – Вып. 6. – С. 745–760.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава 1. Организация работы и оснащение гистологической лаборатории	3
1.1. Ведение учетно-отчетной документации	3
1.2. Хранение исследуемого материала	4
1.3. Лабораторные инструменты и посуда	5
1.4. Правила техники безопасности при работе в гистологической лаборатории	10
Глава 2. Принципы работы основных типов световых микроскопов. Возможности световой микроскопии	13
2.1. Широкопольная микроскопия	16
2.2. Темнопольная микроскопия	16
2.3. Фазовоконтрастная микроскопия	17
2.4. VAREL - контраст.....	18
2.5. Интерференционная микроскопия	19
2.6. Поляризационная микроскопия	19
2.7. Флуоресцентная микроскопия	21
2.8. Цитофотометрия	22
2.9. Цитоспектрофотометрия	23
2.10. Конфокальная и лазерная сканирующая микроскопия	23
2.11. Микроскопия в отраженном свете	25
2.12. Атомно-силовая микроскопия	25
2.13. Автоматический анализ изображений	26
2.14. Подготовка светового микроскопа к работе. Установка освещения по А. Кёллеру	28
Глава 3. Подготовка гистологического материала к изготовлению срезов для светооптического исследования	32
3.1. Взятие материала для гистологического исследования	34
3.2. Принципы и методы фиксации гистологического материала...	38
3.3. Подготовка материала к заливке в плотные среды (промывка, обезвоживание)	43
3.4. Заливка материала в плотные среды	47
3.4.1. Заливка в парафин	47
3.4.2. Заливка в целлоидин	53
Глава 4. Изготовление срезов для светооптических исследований	56
4.1. Устройство и принцип работы санных микротомов	56
4.2. Устройство и принцип работы ротационных микротомов	57
4.3. Дисковые микротомы	58
4.4. Замораживающие микротомы	58

4.5. Криостаты, криокиты	59
4.6. Вибратомы	59
4.7. Микротомные ножи (классификация, правила использования, методы правки и заточки)	60
4.8. Изготовление срезов из материала, залитого в парафин	64
4.9. Изготовление срезов из материала, залитого в целлонднн	69
4.10. Изготовление срезов с использованием замораживающего микротома	70
4.11. Изготовление срезов большой площади (гистотопограмм) ...	71
Глава 5. Методики окрашивания гистологических препаратов	72
5.1. Подготовка срезов к окрашиванию	73
5.2. Общие рекомендации по окрашиванию	74
5.3. Просветление и заключение срезов	75
5.4. Наиболее часто встречающиеся общие методы окрашивания	
5.4.1. Окрашивание гематоксилин-эозином	78
5.4.2. Окрашивание ядерными красителями	81
5.4.3. Окрашивание цитоплазматическими красителями	85
Глава 6. Основные методы окрашивания соединительных и мышечных тканей	86
6.1. Окраска по Ван-Гизону	86
6.2. Окрашивание пикро-пунцовым С	88
6.3. Окрашивание пикро-индигокармином	89
6.4. Окрашивание пикро-анилиновым синим (аллохромный способ Лилли)	89
6.5. Окрашивание по Маллори	90
6.6. Окраска азаном по Гейденгайну	91
6.7. Упрощенная трехцветная окраска по Слинченко	92
6.8. Метод Масона	93
6.9. Упрощенный быстрый метод Масона	94
6.10. Окрашивание коллагеновых волокон фосфорновольфрамовым гематоксилином по Маллори	94
6.11. Импрегнация волокнистых структур соединительной ткани серебром	95
6.12. Импрегнация серебром по методу Фута	96
6.13. Окрашивание эластических волокон методом Унны - Тенцера	97
6.14. Окрашивание гладкой мышечной ткани по Нейберту	100
6.15. Окрашивание сократительного аппарата мышечных клеток леванолом	101
6.16. Быстрый способ полихромной окраски по Н.А.Акимченко ...	101

Глава 7. Обработка и окрашивание костной ткани	103
7.1. Кальций-оксалатный способ определения степени завершенности декальцинации	105
7.2. Окрашивание структур костной ткани тионинном и пикриновой кислотой	106
7.3. Методика заливки недекальцинированной кости в метилметакрилат по Джауси	107
Глава 8. Основные методы изучения структур нервной ткани	108
8.1. Метод Ниссля	108
8.2. Упрощенный метод Ниссля	109
8.3. Упрощенный метод Ниссля (Д.С. Саркисов)	110
8.4. Ускоренный метод Гольджи	111
8.5. Окрашивание миелиновых нервных волокон по Шпильмейеру	112
8.6. Окрашивание по Снесареву	113
8.7. Комбинированный ускоренный метод окрашивания тел нейронов и миелиновых волокон по Викторову	114
8.8. Исследование периферических нервов методом изоляции	115
Глава 9. Окраска органов кроветворения и мазков периферической крови	116
9.1. Окраска по Романовскому-Гимзе	116
9.2. Методика получения крови, изготовления и окраски мазков ..	117
9.3. Окраска азур II – эозином	118
9.4. Окраска пиридин-эозин-азуром по Алфеевой	119
Глава 10. Основные морфологические методы исследования сосудистого русла	121
10.1. Инъекционные методы исследования сосудистого русла	121
10.1.1. Характеристика инъекционных масс для просветленных препаратов	121
10.1.2. Характеристика инъекционных масс для коррозионных препаратов	123
10.2. Беспрепаровочные методы визуализации инъецированных сосудов	124
10.2.1. Методики просветления препаратов	124
10.2.2. Способы коррозии инъецированных препаратов	125
Глава 11. Принципы и методы гистохимического окрашивания	127
11.1. Гистохимия белковых соединений	127
11.1.1. Окрашивание суммарного белка по Бонхегу	128
11.1.2. Реакция тетразониевого сочетания по Даниели	128
11.1.3. Реакция Миллона в модификации Бейкера	129

11.1.4. Методика выявления сульфгидрильных групп, связанных с белком, по Барриетту-Зелигману	130
11.2. Гистохимия нуклеопротеидов	131
11.2.1. Выявление ДНК и РНК по Браше.....	131
11.3. Гистохимия углеводов	132
11.3.1. ШИК – реакция	132
11.3.2. Метахроматическое окрашивание гликозаминогликанов	133
11.3.3. Выявление кислых гликозаминогликанов с помощью коллоидных металлов (реакция Хейла)	134
11.3.4. Окраска альциановым синим	135
11.3.5. Окраска метиленовым синим	136
11.3.6. Окраска кармином по Бесту	136
11.4. Гистохимия липидов	138
11.4.1. Окраска суданом черным по Лизону.....	138
11.4.2. Окраска масляным красным О по Лили.....	139
11.4.3. Окраска фосфолипидов кислым гематинном Бейкера ...	139
11.4.4. Выявление холестерина методом Шульца.....	140
11.5. Гистохимия пигментов	141
11.5.1. Выявление билирубина, гемосидерина и липофусцина по Гленнеру	141
11.5.2. Метод Перлса для выявления трехвалентного железа.....	142
11.5.3. Выявление меланина по Лили	143
Глава 12. Основы иммуногистохимического анализа	144
12.1. Принципы иммуногистохимического анализа	144
12.2. Подготовка материала к иммунному окрашиванию	146
12.2.1. Параформальдегид 4%	147
12.2.2. Фиксирующая жидкость Буэна	147
12.2.3. Фиксатор Замбони (для электронномикроскопических исследований)	147
12.2.4. Использование адгезивного раствора для предметных стекол Novobond Slide Tissue Adhesive (Novocastra Laboratories)	149
12.2.5. Демаскировка антигена при помощи трипсина (рекомендации фирмы Novocastra Laboratories)	151
12.2.6. Раствор для восстановления структуры антигена Retrivagen A (Novocastra Laboratories)	152
12.3. Проведение реакций иммуномеченния и выявление маркера ..	154
12.3.1. Выявление пероксидазы с помощью 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида (ДАБ)	156

12.3.2. Выявление пероксидазы 3-амино-9-этилкарбазолом	156
12.4 Авидин-биотиновая система детекции для иммуногистохимического метода исследования	157
12.5. Стрептавидин-биотиновая система детекции для иммуногистохимического метода исследования	165
12.6 Контроль специфичности иммуномечения	169
Глава 13. Основные методы электронной микроскопии	171
13.1. Основные группы и принципы действия электронных микроскопов	171
13.2. Подготовка материала для электронномикроскопических исследований	173
13.2.1. Осмиевый фиксатор на веронал-ацетатном буфере	175
13.2.2. Раствор тетраоксида осмия	175
13.2.3. Фиксирующие жидкости, содержащие параформальдегид (Б.Уикли, 1975)	176
13.2.4. Заливка в аралдит (Б. Уикли, 1975)	177
13.2.5. Заливка в эпон (Б.Уикли, 1975)	179
13.3. Приготовление и окрашивание полутонких срезов	181
13.3.1. Окрашивание полутонких срезов	182
13.4. Приготовление и контрастирование ультратонких срезов	183
13.4.1. Последовательность операций ультратомии	184
13.4.2. Трудности, возникающие при ультратомии, их причины и способы преодоления.....	186
13.4.3. Окрашивание (контрастирование) ультратонких срезов ...	190
13.4.4 Рабочий раствор свинца	191
13.4.5. Контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой	191
Глава 14. Радиоавтографические методы исследования	193
Глава 15. Витальное окрашивание	198
Глава 16. Цитологические методы исследования	201
16.1. Приготовление мазков (крови, лимфы, красного костного мозга, взвеси органов и тканей)	203
16.2. Приготовление мазков-отпечатков	204
16.3. Приготовление цитологических препаратов путем заключения под покровное стекло	204
16.4. Приготовление цитологических препаратов с помощью цитосантрифуги	205
16.5. Окраска цитологических препаратов по Гимзе	205
16.6. Окраска по Романовскому – Гимзе	206
16.7. Окраска по Паппенгейму	206
16.8. Окраска по Лейшману	207

16.9. Быстрый метод окраски по Алексееву	207
16.10. Окрашивание цитологических препаратов гематоксилин- эозином	207
Глава 17. Методы культивирования	209
17.1. Общие принципы культивирования	209
17.2. Культуральные среды	214
17.3. Факторы адгезии клеток	218
17.3.1. Обработка посуды для культивирования коллагеном	219
17.3.2. Обработка культуральной посуды поли-L-лизинном	219
17.4. Выделение клеток из органов и тканей	220
17.5. Методики культивирования	221
17.5.1. Получение монослойной культуры фибробластов	222
17.5.2. Культивирование стволовых клеток эмбриона крысы ...	223
Глава 18. Исследование биопсийного и операционного материала	225
Глава 19. Основы количественной морфологии (С.С. Степанов, С.А. Барашкова)	234
19.1. Основные методы морфометрии и стереометрии	235
19.2. Статистические методы оценки количественных данных, по- лученных в процессе морфометрического анализа	240
19.2.1. Описание полученных данных	240
19.2.2. Оценка статистической значимости различий и про- верка гипотез	241
19.2.3. Анализ качественных признаков	244
19.3. Компьютерная морфометрия цифровых видеоизображений	247
19.3.1. Определение размера, площади непрозрачного объекта	247
19.4. Компьютерная трехмерная реконструкция биологических объ- ектов с использованием серийных срезов	248
19.4.1. Источники искажений геометрической реалистичности строения ткани при 3D-гистологии	250
19.4.2. Технология компьютерной 3D-гистологии	252
19.4.3. 3D-гистология и морфометрический анализ	256
Приложения	257
Приложение 1. Классификация типов очищенной воды	257
Приложение 2. Состав сбалансированных солевых растворов Дуль- бекко, Хенкса и Эрла.....	258
Приложение 3. Соотношение ингредиентов при приготовлении 0,1 М фосфатного буфера	259
Приложение 4. Соотношение ингредиентов при приготовлении трис-НС1 буфера	259

Приложение 5. Некоторые характеристики буферных систем, применяемых в биологических исследованиях.....	260
Приложение 6. Базовая среда Игла и ее модификации.....	261
Приложение 7. Количество отдельных компонентов, входящих в состав базовой среды Игла	263
Приложение 8. Состав культуральных сред α -MEM, D-MEM, DI-MEM, Хэмса F-10, Хэмса F-12, F-12 в модификации Кунса	264
Приложение 9. Состав сред Фишера, Лейбовица L-15, Фиттон-Джексона, Амеса	268
Приложение 10. Среда с низким содержанием белков и бессывороточные среды для культивирования нетрансформированных диплоидных клеток млекопитающих и некоторых клеточных линий	270
Приложение 11. Фиксация, хранение и сроки доставки материала для гистологического исследования	273
Приложение 12. Рекомендуемый объем биопсирования.....	274
Приложение 13. Направление на гистологическое (цитологическое) исследование	275
Приложение 14. Ведущие фирмы, предлагающие гистологическое оборудование и расходные материалы на российском рынке.....	276
Дополнительная литература	279

Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.Н., Артемьев В.Н.. Гистологическая техника: учебное пособие. – 3-е изд., доп. и перераб. – Омск-Орел: Омская областная типография, 2006. – 290 с.

Рекомендуется учебно-методическим объединением
по медицинскому и фармацевтическому образованию
вузов России в качестве учебного пособия
для студентов медицинских вузов и сузов

Авторы выражают благодарность студентам, членам научного гистологического кружка, Прадун Екатерине, Бековой Гузели, Володиной Анне, Гусаровой Екатерине, Андреевой Марии за помощь при оформлении учебного пособия

Отпечатано и сверстано
в ГП Омская областная типография с электронных носителей
кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ОмГМА.
Подписано в печать 17.05.06. Зак. 1328. Тираж 1000. Усл. печ. л. 16,97.

