ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ

Учебная дисциплина:

«Проведение лабораторных гистологических исследований»

ПРОВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ПМ.05)

2-3 курс

4-6 семестр

Преподаватель Уртаева Лаура Романовна

Владикавказ 2023

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №1

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.

- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.
- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №1

ОРГАНИЗАЦИЯ И ОСНАЩЕНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ЗАБОР, ВЫРЕЗКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ. ФИКСАЦИЯ

ЦЕЛЬ: Познакомится с оснащением, документацией гистологической лаборатории и организацией работы в ней. Освоение методов взятия гистологического материала, приготовление фиксирующих жидкостей.

Теоретические вопросы, подлежащие изучению

1. Требования к оснащению патогистологической лаборатории. Оборудование, инструменты и посуда патогистологической лаборатории.
2. Правила работы и техники безопасности в патогистологической лаборатории.
3. Содержание и значение этапов изготовления гистологических препаратов.
4. Методы и принципы взятия гистологического материала.
5. Хранение и маркировка исследуемого материала.
6. Взятие материала для гистологического исследования. Исследование биопсийного и операционного материала. Общие требования к забору и

консервации материала, правила оформления направления, доставка биопсийного материала.

7. Принципы и методы фиксации гистологического материала.
8. Фиксаторы - классификация, состав.

Вредные факторы при работе в гистологической и патогистологической лаборатории

Работа в гистологической и патогистологической лаборатории связана с освоение методов забора образцов тканей и органов животных и человека, методов обезвоживания и уплотнения материала, техники изготовления гистологических препаратов, методик окрашивания, что обусловливает постоянный контакт лаборанта, преподавателя, студента с потенциально опасным биологическим материалом (трупы животных и людей, в том числе инвазированных, инфицированных, в том числе ВИЧ, пораженных опухолями и т.п.) и воздействием на организм летучих, токсичных и (или) опасных производственных факторов (концентрированные серная, уксусная, азотная и др. кислоты, ацетон, метиловый спирт, этиловый спирт, формалин, сулема, четырех окись осмия, хлороформ, трихлорэтан, ксилол, толуол, эфиры и др.). Окраска гистологических препаратов специальными методами предусматривает выявление патогенных бактерий, грибов, опухолевых клеток.

В процессе освоения раздела «Изготовление гистологических препаратов тканей и органов для проведения диагностических исследований» неизбежно воздействие на организм вредных веществ, относящимися ко 2 и 3 классам опасности, поэтому важно соблюдать при работе в лаборатории требования инструкции по охране труда.

Принципы взятия материала на гистологическое исследование

Материалом для гистологического исследования могут служить кусочки органов и тканей вырезанные из трупов больных людей, умерших в условиях лечебнопрофилактических учреждений, погибших от травм

(производственных, бытовых, спортивных, боевых), воздействия токсических, биологических (бактериальная и вирусная инфекция, в том числе ВИЧ, паразитарная инвазия), термических факторов, экспериментальных животных, полученные путем прижизненного иссечения (биопсии), мазки биологических жидкостей (кровь, лимфа, костный мозг, слизь и др.).

Вскрытие трупов умерших людей производится не ранее чем через 4 часа после констатирования смерти медицинским работником. Поэтому в тканях и органах, взятых из трупов людей, успевают наступить изменения, искажающие некоторые структуры. Из трупного материала можно приготовить хорошие обзорные препараты. Но для тонких цитологических исследований органы трупов людей, как правило, не могут быть использованы. Для изготовления учебных и научных препаратов чаще всего используются кусочки органов и тканей, вырезанные из животных, в том числе подвергнутых экспериментальным воздействиям (физические, химические, бактериальные, вирусные, паразитарные и др. факторы) сразу же после проведения забоя.

Забой экспериментальных животных

Холоднокровных животных (лягушек) убивают, отсекая верхнюю челюсть и голову ножницами без предварительного наркотизирования. Затем длинной иглой разрушают спинной мозг, чем останавливают ее рефлекторные движения. Небольших млекопитающих (мыши, крысы) можно убивать отсечением головы. Чаще небольших животных убивают с помощью хлороформа или эфира. Животное помещают под большую стеклянную емкость, куда кладут вату, пропитанную наркотическим веществом.

Небольших животных перед вскрытием прикрепляют с помощью ниток к специально приспособленной дощечке или пластмассовой пластинке. Шерсть животного смачивают водой, чтобы при вскрытии волосы не попали в грудную и брюшную полости и не загрязни ли материал, который будет взят для фиксации.

Вскрытие лабораторных животных

Сначала ножницами вырезается лоскут кожи вдоль средней линии от нижней части живота до шеи. Затем кожа по сторонам от разреза отделяется тупым образом от тканей, лежащих за ней, и прикрепляется иголками к доске. Открытая мышечная ткань протирается тампоном с теплым физиологическим раствором. Переднюю стенку живота приподнимают хирургическим пинцетом и прорезают ножницами по средней линии. Край разреза зажимами Пеана оттягивают в сторону, что дает широкий доступ к органам брюшной полости. Грудная полость вскрывается разрезами с обеих сторон от грудины с помощью ножниц. Грудину с реберным хрящом удаляют.

Вскрытие трупов людей

Вскрытие (аутопсия, секция) - патологоанатомическая или судебно-медицинская процедура, производится для того, чтобы установить причину смерти. Труп вскрывают, проводя разрез так, чтобы в наибольшей степени обнажить внутренние органы. Из органов и тканей вырезают кусочки для гистологического исследования.

Взятие материала для фиксации

При микроскопическом исследовании тканей и органов большое значение имеет техника взятия материала. Поэтому при иссечении кусочков необходимо соблюдать следующие правила.

1. Объекты, подлежащие исследованию, должны быть прежде всего свежими.
2. Нельзя брать для фиксации большие кусочки органа или ткани. Их длина, ширина и толщина не должны превышать 15 х 10 х 4 мм.
3. Вырезая кусочек, необходимо учитывать гистологическое строение органа. Если оно одинаково на поверхности и в глубине, как в печени, то не имеет значения откуда взят кусочек. Если строение под капсулой и в глубине разное, то следует стремиться к тому, чтобы на препарате были все пласты или зоны органа. Это относится к почкам, надпочечникам, сердцу. Для исследования топографических отношений между оболочками сердца лучше брать кусочек предсердия (стенка более тонкая и в кусочке будут все

оболочки — эндокард, миокард, эпикард). Стенки полых органов (мочевой пузырь, кишечник и пр.) исследуют на поперечных сечениях.

4. При взятии патологически измененного материала кусочки берут на границе с нормальными участками, чтобы на срезы попали и те, и другие, или исследуют одни кусочки из поврежденных мест, а другие — с границы с нормальной тканью.
5. Во избежание нежелательного размозжения тканей иссечение кусочков необходимо производить только острыми инструментами.
6. Материал должен быть пронумерован и маркирован.

Для каждого органа существуют соответствующие правила взятия материала. Специальных подходов требует *фиксация легких*. После вскрытия плевральной полости легкие спадаются, теряют воздушность. Трахею отсекают выше наложенного зажима. Отделяют трахею от соединительной ткани средостения и, вытягивая легкие вместе с сердцем. В трахею вставляют трубочку, через которую умеренно раздувают легкие, а трахею ниже трубки перевязывают, лигатурой. Раздувание легких перед фиксацией приводит к тому, что на гистологических срезах хорошо видны альвеолы, альвеолярные мешочки и альвеолярные ходы. При взятии материала от крупных животных или человека трубочку вставляют не в трахею, а в долевой бронх и берут только долю органа. Раздувание легких не проводят, если они исследуются для определения наличия и характера патологических изменений в органе, ибо это может искусственно усложнить задачу патолога.

При изучении легких не подходит и способ убивания животных путем отсечения головы, так как при этом кровь вместе с воздухом попадает в бронхи и респираторные отделы.

Паренхиматозные органы (печень, почки, селезенка, сердце и др.) от мелких животных можно брать целиком, но надо надсечь их капсулы. Для цитологических исследований необходимо разрезать орган на мелкие кусочки и их зафиксировать. Это касается и органов трупа человека и крупных животных. Материал вырезают острыми бритвами и малыми ножницами.

Для получения качественных препаратов со стенки пищеварительных

органов необходимо не давать животному пищи в течение двух суток. После вскрытия брюшной полости для взятия материала с *тонкой кишки* необходимо перевязать лигатурой границы участка, который надлежит исследовать, вырезать его снаружи от лигатур, перенести в теплый физиологический раствор. Поперек оси отрезают кусочки кишки длиной 20 мм, разрезают их вдоль оси напротив брыжейки. Если слизистая оболочка чистая, кусочек без ополаскивания переносят в фиксатор. Кишку мелких животных можно фиксировать без разреза вдоль оси. *Материал стенки желудка* и пограничных с пищеводом и привратником участков берут через 1-1,5 ч после забоя, когда гладкая мышечная ткань теряет способность сокращаться. Иначе при фиксации отслоится эпителий или вся слизистая из-за резкого сокращения мышечной ткани. Вырезают весь желудок с прилегающими участками пищевода и двенадцатиперстной кишки и переносят в ванночку. Разрезом вскрывают желудок, пищевод и дуоденум и, распластав его (но сильно не растягивая), прикрепляв ют к дощечке. Слизистую промывают теплым физиологическим раствором (для удаления слизи и желчи), закрывают гигроскопичной ватой, смоченной фиксатором. Через 1 ч вырезают необходимые участки и переносят в фиксатор.

Для взятия *кусочков головного и спинного мозга* после удаления кожи и мышц черепа или позвоночника пилкой и костевыми щипцами, ножницами, скальпелем вскрывают черепную полость или спинномозговой канал. Оголяют мозг, перерезают нервы, освобождают мозг, разрезают его на кусочки бритвой. Кусочки помещают в фиксатор (на нитке или кладут на вату). У мелких животных *глаз* фиксируют вместе с головным мозгом; у крупных — глаз аккуратно удаляют из орбиты, освобождают от соединительной ткани и мышц, делают метки, необходимые для ориентации, и помещают в фиксатор. Если сохранять стекловидное тело не нужно, то с помощью шприца фиксатор вводят внутрь глаза.

Кусочки поперечно-полосатой и гладкой мышцы выдерживают несколько часов в вате, смоченной физиологическим раствором, а потом помещают в фиксатор. Иначе плохо выявляется исчерченность и видны волны сокращения.

Кусочки кости обязательно выпиливают лобзиком, а не откусывают кусачками.

Фиксация

Процесс подготовки ткани играет решающую роль при последующем гистологическом анализе (гистохимической реакции). Фиксация первый и очень ответственный этап в гистологической технике, призванный сохранить ткани и органы в состоянии, близком к тому, в котором они находились до момента смерти.

При этом исследуемая ткань переводится из лабильного живого состояния в стабильное неживое. Для этой цели используется два способа фиксации:

- консервирование материала глубоким замораживанием;
- химическая фиксация.

В первом случае при помощи быстрого замораживания (в изопентане, фреоне, охлаждённых до -180 С) достигается полная остановка всех жизненных процессов и стабилизация структуры ткани.

Крупные кристаллы льда, способные повредить структуру замороженной ткани, не образуются, а мелкие - способствуют её сохранению.

При химической фиксации в тканях происходят сложные физико-химические изменения, в частности коагуляция (осаждение) белков. Фиксаторов, которые бы полностью сохраняли структуры, нет. Они существенно уплотняют ткани, уменьшают их объем, приводят к необратимым изменениям. Разные фиксаторы в разной степени сохраняют разные структуры.

Из большого числа предложенных фиксирующих средств практическое применение в работе патологоанатомических отделений имеет лишь небольшая часть их.

Все фиксирующие средства делятся на простые и сложные в зависимости от того, входит ли в их состав одно какое-нибудь вещество или насколько.

При работе с любыми фиксирующими жидкостями необходимо соблюдать некоторые общие правила.

1. Используется идеально чистая стеклянная посуда с широким горлом.
2. Материал перед фиксацией запрещается обмывать водой

3. Объем фиксатора должен в 20—40 раз превышать объем кусочков.
4. На дно посуды кладут стеклянную вату или марлю, которые создают условия для равномерного обмывания кусочка.
5. Материал помещают в фиксатор сразу после взятия.
6. Размеры кусочков должны быть не более 10—15 мм в длину, 5—10 мм в ширину, 3—5 мм в толщину.
7. Если после контакта с материалом фиксатор поменял цвет или помутнел, его заменяют новым.
8. Повторно фиксатор не используют. Готовят его непосредственно перед применением.
9. Обычно фиксация проводится при комнатной температуре. Ее можно ускорить в термостате (при 37—40 °С).
10. Продолжительность фиксации зависит от свойств фиксатора. Если при разрезе в центре кусочек отличается по окраске от периферии, то фиксацию нужно продолжить.

Простые фиксаторы: ***формалин, этанол, метанол, ацетон, соли тяжёлых металлов.***

Формалин.

Формалин (формол) представляет собой 35—40% водный раствор формальдегида — альдегида муравьиной кислоты. Это бесцветная жидкость с резким запахом, употребляемая в разведении 1:10 (4% раствор формальдегида). На практике исходный раствор обычно принимают за 100% и из него готовят 5%, 10%, 20% растворы формалина, что соответствует 2%, 4%,8% растворам формальдегида. В качестве растворителя
употребляют водопроводную воду или физиологический раствор.

Формалин быстро проникает в ткани и хорошо их фиксирует. В течение 24—48 ч кусочки уплотняются и из них можно делать срезы и на замораживающем микротоме.

Большим достоинством формалина является возможность сохранять в нем

кусочки годами. Если от длительного хранения материал стал излишне плотным, его можно смягчить в 10% растворе лимонной кислоты. Однако при длительном хранении в формалине в материале могут образоваться темно-коричневые гранулы, которые искажают гистологическую картину. Этого можно избежать, промывая фиксированный материал большим количеством воды.

Формалин может иметь очень кислую реакцию. Для нейтрализации формалин наливают в темную банку, на дно которой насыпают порошкообразный мел (углекислый кальций - CaCOз) или магнезию (на 1 л формалина 100 г мела или магнезии). Содержимое сосуда взбалтывают. Через сутки формалин обычно имеет нейтральную реакцию. Периодически степень нейтрализации формалина следует проверять индикаторной бумагой.

Для приготовления 10% (4%) нейтрального формалина к 10мл 40% нейтрального формалина приливают 90 мл. проточной воды.

Этиловый спирт (этанол) **—** для фиксации употребляют как абсолютный, так и 95% спирт. Абсолютный спирт меньше деформирует клетки. По сравнению с формалином этиловый спирт слабее проникает в ткани, поэтому кусочки следует брать не толще 3 — 5 мм. Продолжительность фиксации — от нескольких часов до 1 суток. В 95% спирте возможно длительное хранение объектов и после окончания фиксации, но с этой целью их лучше перенести в 80% спирт. Рыхлые, отечные, слизистопере-рожденные ткани в спирте сильно сморщиваются.

Спиртовая фиксация употребляется при исследовании железа, бактерий, гликогена, окраске по Нисслю. Ее положительным качеством является способность одновременного обезвоживания объектов, сокращающая этап заливки в целлоидин или парафин. Спиртовая фиксация позволяет резать ткань и на замораживающем микротоме. Для этого кусочки отмывают от спирта в проточной воде в течение 3—6 ч. Промывание проводят в широко-гордой банке, завязав ее горло марлей. Отмытые от спирта кусочки (кроме кусочков легких и жировой ткани) тонут в воде.

Ацетон используют в качестве быстрого фиксатора, если требуется неотложное исследование, а замораживающий микротом использовать не представляется возможным. Ацетон сильно сморщивает ткани. Для фиксации берут маленькие кусочки (2х3 мм). Фиксацию проводят в течение 2—3 ч в двух порциях ацетона. Пригоден только обезвоженный, прозрачный, бесцветный ацетон.

Сложные фиксаторы. К ним относятся смеси, состоящие из нескольких фиксирующих веществ: ***формалиновые смеси (Бэкера, Лилли, Серра и др.), пикриновые фиксаторы (Буэна, Жандра и др.), хромовые, сулемовые, осмиевые и др.***

Ценкер-формол является хорошей фиксирующей смесью.

Приготовление:

1. В отдельной посуде готовят жидкость Мюллера (в 100 мл дистиллированной воды растворяют при нагревании 2,5 г калия бихромата и 1 г натрия сульфата);
2. К 100 мл жидкости Мюллера добавляют 5 г сулемы и 10 мл формалина.

Продолжительность фиксации не более 6 ч. Промывка в проточной воде — 24 ч. Для удаления из кусочков сулемы их переносят в 70% спирт, содержащий 10% настойку йода, или спиртовый йодкалиевый раствор (2 г йода и 3 г калия йодида растворяют в 100 мл спирта до получения цвета крепкого чая). Если через 24 ч после опускания кусочков раствор обесцветится, их переносят в новую порцию йодированного спирта до того момента, пока раствор не перестанет изменять цвет. Это наиболее пригодный фиксатор для гематологических исследований, если в дальнейшем для окрашивания срезов или мазков пользуются азур-эозином, краской Романовского— Гимзы. Фиксатор дает хорошие результаты при цитологических исследованиях.

Жидкость Буэна - наиболее часто употребляемый фиксатор. Необходимо готовить непосредственно перед употреблением.

Приготовление:

Пикриновая кислота - 15 мл (насыщенный раствор);

Формалин (40%) - 5 мл;

Ледяная уксусная кислота - 1 мл.

Насыщенный раствор пикриновой кислоты должен быть заранее приготовлен. Для этого требуется растворить 24 г. сухой пикриновой кислоты (взрывоопасна!) в 1 л горячей воды.

Минимальное время фиксации жидкостью Буэна 4-24 часа. Более продолжительный срок фиксации улучшает результаты. После фиксации материал перенести последовательно в три порции 70° спирта и далее обезводить. (Промывка в воде бесполезна, так как пикриновая кислота в ней плохо растворяется.) Заливается материал после фиксации в жидкости Буэна в парафин. Жидкость Буэна рекомендуется для исследований соединительной и мышечной тканей, а также для приготовления обзорных препаратов.

Жидкость Карнуа. Готовить его необходимо непосредственно перед употреблением, так как хлороформ быстро испаряется. Приготовить фиксатор.

Состав:

Абсолютный этанол — 60 мл;

Хлороформ - 30 мл;

Ледяная уксусная кислота - 10 мл.

Фиксация достигается очень быстро: от 10 минут до 3 - 4 часов. Однако хранить материал в этой жидкости нельзя, так как это ведет к значительному сморщиванию объекта. После фиксации материал сразу же помещают в абсолютный спирт. Этот фиксатор дает очень хорошие результаты при исследовании ядер, незаменим при исследовании нуклеиновых кислот, белков, гликогена.

Задание

1. Приготовьте согласно прописям фиксирующие жидкости:
   1.1. 10% раствор формалина;
   1.2. этиловый спирт для фиксации;
   1.3. смесь Буэна;

1.4. смесь Карнуа.

2. Произведите забой и вскрытие лабораторного животного (крысы);
3. Для гистологического исследования возьмите небольшие кусочки органов (длина 10-15 мм, ширина 5-10 мм, толщина 3-4 мм), при этом используйте очень острые инструменты (бритвы, скальпели, малые ножницы).
4. К каждому кусочку органа приложите этикетку с указанием кода животного и органа. Все данные занесите в журнал.
5. Зафиксировать:
   5.1. в 10% формалине - стенку желудка, кусочек почки, надпочечника;
   5.2. в 95% этиловом спирте - печень;
   5.3. в смеси Буэна - кусочек гонады, языка, кишки, трахеи, тимуса;
   5.4. в смеси Корнуа - стенку мочевого пузыря, кусочек печени, матки,

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №2

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.
- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №2

ПРОВОДКА МАТЕРИАЛА: ОБЕЗВОЖИВАНИЕ, ПРОПИТКА В ПАРАФИНЕ

ЦЕЛЬ: Освоение методов обезвоживания материала.

Теоретические вопросы, подлежащие рассмотрению

1. Сущность и этапы проводки фиксированного материала через обезвоживающие среды.
2. Заливка в уплотняющую среду.

Методика проводки фиксированного материала через обезвоживающие среды

Для приготовления тонких гистологических срезов объекты уплотняют с помощью заморозки или заливки в парафин. Но парафин в воде не растворяется, поэтому кусочки фиксированной ткани предварительно необходимо обезводить. При работе с замораживающим микротомом необходимости в обезвоживании нет.

Промывка материала перед его дальнейшей обработкой производится не всегда. Если после фиксации формалином ткань следует промывать 12-24 ч, то после фиксации в Буэне необходимость в промывке отпадает. Если использовать спиртовые фиксаторы, то начинать проводку следует со спирта следующей по крепости концентрации.

Проводка.

Для обезвоживания служит набор (или батарея) спиртов (этиловый, реже другие спирты) повышающейся концентрации.

Приготовление спиртов различной концентрации. Обычно исходным для приготовления спиртов различной концентрации служит 95° спирт.

Практически для приготовления спирта необходимой крепости и в нужном количестве можно пользоваться следующей таблицей 2.

Таблица 2

Для получения 100 мл	Нужно взять миллилитров							
	95° спирта	H2O	90° спирта	H2O	80° спирта	H2O	70° спирта	H2O
40°	42	58	44	56	50	50	57	43
45°	47	53	50	50	56	44	64	36
50°	52	43	56	44	63	37	71	29
60°	63	37	67	33	75	25	86	14
70°	73	27	78	22	88	12	-	-
80°	83	17	89	11	-	-	-	-
90°	94	6	-	-	-	-	-	-

Иногда можно пользоваться и другим расчетом: брать столько миллилитров спирта, какой крепости желательно иметь спирт, и к нему доливать такое количество воды, чтобы сумма его с количеством взятого спирта давала цифру крепости исходного спирта. Например, исходный спирт 95°, желательно получить 50°. Для этого берут 50 мл 95° спирта и добавляют воды до 95 мл, т. е. 46 мл. Незначительной неточностью можно пренебречь.

В качестве исходного материала для получения абсолютного спирта также служит 95° этиловый спирт. Отнимая из него 4% воды, получают абсолютный спирт. Он должен представлять собой бесцветную жидкость, почти не имеющую запаха («спиртной запах» получается при разбавлении водой). Отнятие воды от спирта основано на связывании последней веществами, жадно поглощающими воду. Наиболее пригодным в этом отношении является обезвоженный медный купорос.

Для обезвоживания 95° спирта употребляется белый порошок прокаленного медного купороса. В бутылку с хорошо притертой пробкой наливают 100 мл или 200 мл 95° спирта. В это количество спирта высыпают соответственно 10 или 20 г обезвоженного медного купороса. В течение 1—2 дней бутылку часто энергично встряхивают. Белый цвет порошка прокаленного

купороса переходит в голубой. Однако при этом связывается не вся вода спирта, и спирт из первой бутылки осторожно сливают в другую бутылку с белым порошком прокаленного медного купороса и продолжают энергично встряхивать. Если порошок медного купороса слегка посинеет, то спирт осторожно сливают в третью бутылку с новым порошком прокаленного медного купороса. На дне бутылки, наконец, будет оседать не синеющий более порошок прокаленного медного купороса, а над слоем будет отстаиваться прозрачный, уже обезвоженный спирт. Абсолютный спирт осторожно сливают или фильтруют в чистую сухую бутылку и закупоривают ее резиновой пробкой.

Хорошие результаты даёт использование вместо абсолютного спирта 950 спирта. При этом качество гистологического материала не становится хуже.

Материал обезвоживают в чисто вымытых и высушенных банках с притертыми пробками, лучше всего емкостью 1000 мл. В эти банки наливают спирты определенной крепости с таким расчетом, чтобы уровень их был выше объекта по крайней мере на 1—2 см.

Большое значение для получения хороших микроскопических препаратов имеет постепенность обезвоживания. Чем нежнее объект и чем больше опасность его сжатия и сморщивания, тем постепеннее надо повышать крепость спирта. Нельзя сразу после промывки помещать материал в 95° спирт, но если промывка производилась спиртом, то обезвоживание начинают со спирта более высокой концентрации.

Материал небольшими кусочками толщиной от 1—1,5 мм до 1—2 см последовательно переносят из спирта в спирт. Время пребывания материала в спиртах различно для разных тканей, оно зависит от размеров объекта и может составлять от 1—2 часов для очень маленьких объектов и до 1—2 суток для объектов толщиной 2 см. Поскольку полное обезвоживание — важнейшее условие успешной заливки, то материал, как правило, выдерживают в каждом спирте не менее 24 часов.

При перекладывании материала из слабого спирта в спирт более высокой концентрации кусочки надо тщательно осушить фильтровальной бумагой. Это предотвращает быстрое снижение крепости каждого последующего спирта.

Спирты не следует слишком долго повторно употреблять, так как они загрязняются веществами, извлекаемыми из материала, особенно жиром. Спирты не должны быть мутными. Для проверки степени насыщенности спиртов жирами нужно смешать небольшое количество спирта из батареи с водой и, если появится белая густая муть (эмульсия), данный спирт необходимо заменить новым.

После удаления воды в спиртах объект переносится в хлороформ с целью удаления спирта.

В холороформ-парафине ткань пропитывается парафином, а в расплавленном парафине (I и II) из объекта удаляется хлороформ. Выдерживание кусочков в парафине связано с необходимостью освободить объекты от хлороформа.

Ниже приводится схема проводки после формалина для мелких кусочков.

Схема проводки после фиксации в формалине:

1. 40%этанол - 2часа(до 24 часов)
2. 50%этанол - 2часа(до 24 часов)
3. 60%этанол - 2часа(до 24 часов)
4. 70%этанол - 2часа(до 24 часов)
5. 80% этанол - 2 часа (до 24 часов)
6. 95% этанол - 2 часа (до 24 часов)
7. 100%(I) этанол - 2 часа (до 24 часов)
8. 100%(П) этанол - 2 часа (до 24 часов)
9. Хлороформ I - 30 минут
10. Хлороформ II - 30 минут
11. Хлороформ + парафин (в термостате при 37°С) - 30 минут
12. Парафин I (в термостате при 56°С) - 30 минут
13. Парафин II (в термостате при 56°С)- 30 минут

Схема проводки после фиксации в смеси Буэна:

1. 70% этанол - 24 ч. и более

2. 80% - 24 ч.
3. 95% - 24 ч.
4. 1ОО%(I)-244.
5. 100%(П) - 24ч.
6. Хлороформ I - 3ч.
7. Хлороформ II - 3 ч.
8. Хлороформ + парафин (в термостате при 37°С)- 12-24 ч.
9. Парафин I (в термостате при 56°С) - 1ч.
10. Парафин II (в термостате при 56°С) 30-40 мин.

Традиционно проводку осуществляли путем последовательного погружения ткани в растворы ксилола и этилового спирта, однако такой метод имеет ряд существенных недостатков: трудоемкость, длительность (до четырех суток), испарение реагентов в воздух лаборатории (что небезопасно для сотрудников лаборатории, так как ксилолы образуют взрывоопасные паровоздушные смеси, вызывают острые и хронические поражения кроветворных органов, при контакте с кожей — дерматиты), а также нестабильное качество получаемой ткани, зависящее от человеческого фактора, а именно действий лаборанта. Для решения проблем такого рода лаборатории используют альтернативные реагенты, такие как изопропанол, являющийся нетоксичным, а также аппараты — гистопроцессоры (рис. 1), имеющие закрытый контур и таким образом не допускающие испарений в воздух лаборатории. Путем использования гистопроцессоров также можно значительно уменьшить время проводки по сравнению с ручным методом за счет применения вакуум-инфильтрационной и микроволновой методик.

Задание

1. Приготовить спирты соответствующих концентраций.
2. Провести этикетирование зафиксированного материала.
3. По прописи проводки довести объекты до хлороформ-парафина.
4. Оформить результаты работы.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №3

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.

- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №3
ЗАЛИВКА ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ЗАТВЕРДЕВАЮЩИЕ СРЕДЫ

ЦЕЛЬ: Освоение метода заливки материала в парафин.

Теоретические вопросы, подлежащие рассмотрению

1. Заливка материала в целлоидин:
1.1. приготовление растворов целлоидина;
1.2. методика заливки в целлоидин;
2. Заливка гистологического материала в парафин:
2.1. подготовка парафина;
2.2. методика заливки в парафин;
2.3. наклеивание парафиновых блоков;
3. Заливка в желатину.

Заливка в затвердевающие среды. Перечень сред.

Парафин

После обезвоживания в спиртах материал уплотняется, однако степень плотности материала не достаточна для изготовления срезов. Поэтому на следующем этапе изготовления гистологических препаратов проводят заливку материала в затвердевающие среды. В качестве затвердевающих сред

используют желатин, целлоидин, парафин и др.

Заливка в парафин - наиболее широко распространенный метод консервации материала и изготовления блоков для микротомирования. Парафин - смесь предельных углеводородов с 20-30 атомами углерода. Для заливки применяют гомогинезированный парафин (температура плавления - 54-56 С). Для лучшей резки добавляется воск: на 100 г парафина 3-5 г воска.

Подготовка парафина. Чтобы избавиться от газов и примесей, парафин кипятят с дистиллированной водой несколько часов (повторить несколько раз). Затем в термостате разгоняют по фракциям: легкоплавкие 54-46°С и тугоплавкие 56-57°С. Для удаления газов из расплавленного парафина можно использовать вакуумный термостат.

Преимущества заливки в парафин: Доступность. Быстрота. Возможность изготавливать тонкие (до 2 мкм) серийные срезы. Объекты в парафиновых блоках хранятся годами.

Недостатки: Сжатие заливаемого материала (на 8-20%). Необходимость подвергать ткань действию высокой температуры (56-57°С).

В последние десятилетия часто в лабораториях используют современные гомогенизированные парафиновые среды, например «Гистомикс», который содержит в своём составе натуральный воск и полимерные добавки. Точка плавления «Гистомикс» 520.

Другие затвердевающие среды

Целлоидин - заливка рекомендуется для трудно режущихся объектов (декальцинированные кости, чешуя, кожа и др.). Серийные срезы готовить трудно, метод работы длителен.

Желатин - для заливки рыхлых и легко распадающихся тканей, подготавливаемых для резки на замораживающем микротоме.

Методика заливки в парафин

Объекты из смеси парафин-хлороформ переносят в чистый растопленный парафин, который должен быть заранее приготовлен и стоять в термостате, установленном на 2-30 выше точки плавления парафина (около 520).

После того, как кусочки пробыли во втором парафине достаточное время,

берут формочку, наливают в нее горячий парафин. Проводить манипуляции надо быстро и четко. Ставят ее в чашку, на дне которой налита вода (это необходимо, чтобы на дне формочки парафин немного подстыл). Далее кусочек переносят в формочку. Надо внимательно контролировать, чтобы объект не попал в пленку подстывшего парафина. Во избежание преждевременного застывания парафина пинцет и тигль подогревают на спиртовке.

После образования на поверхности формочки пленки из застывшего парафина, ее переносят в глубокую чашку и ставят на 5-10 минут под водопроводную воду.

Когда парафин полностью застыл, его извлекают из формочки. Парафин должен быть совершенно однородным, если в нем обнаруживаются беловатые участки, то это свидетельствует о наличие в нем промежуточной среды (хлороформа). В этом случае надо провести повторную заливку.

Из затвердевшего парафина вырезают скальпелем блоки, оставляя вокруг каждой стороны объекта каемку парафина шириной 2 мм.

Парафиновые блоки наклеивают на парафиновые колодки той стороной, на которой больше парафина. Для этой цели используют, нагретый на спиртовке шпатель.

Существуют специальные аппараты для заливки материала в парафин.

Станция для заливки парафином ЕС 350-2 (рис. 2), позволяет максимально упростить и ускорить процесс формирования парафинового блока, улучшить качество изготовляемого блока, что в свою очередь облегчает изготовление качественного среза.

Станция состоит из 2-х отдельных консолей.

1. Термоконсоль с дозатором имеет два отделения для кассет и блоков с автономным контролем температур в диапазоне от 50 до 70°С. На этой же консоли находится дозатор, который представляет собой резервуар для парафина объемом 5 л, подогреваемую рабочую поверхность и ячейки для щипцов, а также охлаждающую площадку.

2. Охлаждающая консоль - это поверхность для охлаждения парафиновых блоков, температура на которой может регулироваться в диапазоне от -5 до

+7°C.

Станция для заливки в парафин ЕС 350, оснащена функцией «программируемые рабочие часы», включая автоматический старт. Температура всех поверхностей независимо регулируются, программируется по времени и информация о параметрах прибора отражается на жидкокристаллическом дисплее.

Порядок работы на заливочной станции ЕС 350-2:

1. Подключите станцию к сети.
2. На задних панелях термо- и охлаждающей консолей включите включатели.
3. Дождитесь когда парафин в резервуаре нагреется до заданной температуры и растопится.
4. Для заливки используйте металлические формы соответствующего кусочку размера или самостоятельно изготовленные кораблики из плотной бумаги.
5. Используйте только горячие инструменты (пинцеты, препаровальные иглы, ножницы), предварительно помещённые в подогреваемые ячейки на Термоконсоль.
6. Кассету с материалом в подогреваемом отделе откройте, прочитайте на вложенной в кассету этикетке кодировку и перенесите кодировку на форму для заливки (кораблик).
7. Не допускайте застывания парафина на кусочке органа и образования на нём парафиновой плёнки!
8. Форму для заливки установите под отверстие подачи горячего парафина, нажмите на пластинку подачи парафина и налейте парафин в форму.
9. Горячим пинцетом возьмите кусочек органа из кассеты и поместите его в центр формы для заливки; если это кусочек полого органа (пищевод, желудок, кишечник, трахей и т.д.), то его нужно расположить так, чтобы в дальнейшем в срез попали все оболочки органа.
10. Перенесите заливочную форму с кусочком органа на охлаждающую площадку, если используется металлическая форма, то установите сверху

формы заливочное кольцо.

11. Протапливайте парафин вокруг кусочка горячим пинцетом.
12. После образования плёнки на поверхности парафина, перенесите форму на охлаждающую консоль.
13. Дождитесь полного застывания парафина в форме.

Задание

1. Приготовить формочки (кораблики) для заливки объекта.
2. Залить объект и парафин.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №4

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.

- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №4

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕЗОВ НА МИКРОТОМЕ, КРИОТОМЕ.

ЦЕЛЬ: Освоение техники изготовления парафиновых срезов на ротационном микротоме.

Теоретические вопросы, подлежащие рассмотрению

1. Устройство и принцип работы ротационных и санных микротомов. Устройство и принцип работы замораживающего микротома.

2. Техника изготовления парафиновых срезов. Погрешности, встречающиеся при изготовлении срезов и способы их устранения. Подготовка предметных стёкол для переноса на них срезов.

Подготовка залитого материала к работе

1. Скальпелем обрезается лишний парафин на блоке, которому придается форма прямоугольного параллелепипеда.

2. Блоки, наклеенные на колодки, закрепляют в объектодержателе.

Микротомы

Детальное изучение клеток и тканей производится на гистологических

срезах, изготовленных с помощью микротома.

Микротом (от греч. mikros — малый и tome — разрезание, отсечение) — прибор для изготовления гистологических срезов. Среди существующих моделей микротомов наиболее распространены санные, радиальные и ротационные. Основными частями микротома являются: массивная станина (корпус), подающий механизм с
микрометрическим винтом, держатель объекта (или столик) и держатель микротомного ножа.

Санные микротомы (рис. 3) используют для получения срезов тканей, предварительно заключенных в парафин или целлоидин. Основные части санного микротома: станина, механизм микроподачи, механизм подъема, объектные салазки с зажимом для ткани, суппорт с ножедержателем.

В санных микротомах в верхней части станины расположены шлифованные плоскости, по которым скользит массивный подвижный суппорт. В суппорте закреплен держатель ножа, снабженный устройством, которое позволяет установить нож либо поперечно к направлению его движения (для замороженных и парафиновых срезов), либо косо (для целлоидиновых срезов), а также изменять угол наклона ножа. При отведении ножа назад до отказа включается полуавтоматический подающий механизм, поднимающий держатель объекта (столик) на заданное количество микронов. Держатель объекта снабжается винтами, позволяющими закрепить блок в нужном положении по отношению к плоскости движения ножа. Микрометрический винт подающего механизма в большинстве современных моделей устанавливается в наклонной плоскости, но выпускаются и модели с вертикальным расположением винта. Реже в санных микротомах нож устанавливается неподвижно, а по шлифованным плоскостям передвигается объект с держателем.

Порядок работы на санном микротоме НМ 400:

1. Подготовьте предметные стёкла, выложите 10-15 стёкол на лоток.
2. Подпишите стёкла простым карандашом (нанесите кодировку с блока на стёкла).

3. Проверьте, зафиксирована ли рукоятка микротома.

4. Установите блок в зажим блокодержателя, установите зажим с объектом в необходимом положении путём поворота рукояток.

5. Установите микротомный нож в паз ножедержателя и закрепите винтами.

6. Проверьте угол наклона ножа, он должен составлять 13-150.

7. С помощью микрометрического винта установите толщину среза для грубой подрезки (10-20-30-400).

8. Подведите нож к блоку. Отведите рукоятку ножа назад до толчка, при этом задаётся выставленная толщина среза, затем приведите нож вперёд, сделайте срез.

9. С помощью грубой подрезки выровняйте поверхность среза, выйдите на ткань кусочка.

10. После того как поверхность среза выровнена, переведите микрометрический винт в положение желаемой толщины среза (5-7 мкм).

11. Плавными движениями сделайте срез. Не забывайте отводить нож назад до толчка.

12. Микротомной кистью или препаровальной иглой перенесите срез в ёмкость с тёплой водой (34-400), при этом срез поместите на поверхность воды стороной, которая была обращена к ножу (блестящей).

13. Очень осторожно расправьте срез на воде препаровальными иглами.

14. Возьмите за боковые поверхности подписанное предметное стекло, опустите край стекла в воду и, подхватив срез, поместите его на стекло.

15. Предметное стекло со срезом поместите на термостолик, предварительно нагретый до 37-400.

16. Дождитесь, пока парафин на стекле со срезом расплавится, станет прозрачным и в нём появятся мелкие пузырьки (около 20-40 мин.).

17. Снимите стекло со срезом с термостолика. Теперь оно готово к депарафинизации и окраске гистологическими красителями.

Ротационный микротом (рис. 4) имеет неподвижный нож,

горизонтально закрепленный лезвием вверх. Держатель объекта передвигается вверх и вниз путем вращения колеса рукой или мотором. Специальный механизм выдвигает держатель объекта при каждом его поднятии на заданное количество микронов. Срезы один за другим сползают с ножа на специальную ленту, движущуюся синхронно с держателем. Этот тип микротомов особенно удобен для получения серийных срезов с залитого в парафин материала.

Названные типы микротомов позволяют получать срезы не тоньше 1 мк (обычно 4—15 мк). Для получения более тонких срезов, например, для работы с электронным микроскопом, служат ультратомы и ультрамикротомы.

Для работы студентов на занятиях в нашем вузе используют **ротационный механический микротом HM 315 R** (рис. 4) предназначен для производства срезов из материала, залитого в парафин. Микротом снабжён системой ретракции, т.е. системой отведения ножа при возвратном ходе, которая позволяет сохранить поверхность образца, а также срок службы ножа или лезвия. Микротом с ручным режущим ходом и системой подачи, имеется встроенный лоток для отработанных срезов. Толщина получаемого среза 0,5 - 60 мкм.

Порядок работы на ротационном механическом микротоме HM 315 R:

1. Подготовьте предметные стёкла, выложите 10-15 стёкол на лоток.
2. Подпишите стёкла простым карандашом (нанесите кодировку с блока на стёкла).
3. Проверьте, зафиксирована ли рукоятка микротома.
4. Установите блок в блокодержатель так, чтобы длинная сторона блока располагается по горизонтали, поверхность блока параллельна лезвию ножа.
5. Установите микротомный нож в держатель ножа.
6. Проверьте угол наклона ножа, он должен составлять 13-150.
7. Подведите блок к лезвию ножа с помощью рукоятки на левой стороне микротома.
8. С помощью микрометрического винта установите толщину среза для грубой

подрезки (10-20-30-400).

9. С помощью грубой подрезки выровняйте поверхность среза, выйдите на ткань кусочка.
10. После того как поверхность среза выровнена, переведите микрометрический винт в положение желаемой толщины среза (4-5-6 мкм).
11. Плавными движениями сделайте срез.
12. Микротомной кистью или препаровальной иглой перенесите срез в ёмкость с тёплой водой (34-400), при этом срез поместите на поверхность воды стороной, которая была обращена к ножу (блестящей).
13. Очень осторожно расправьте срез на воде препаровальными иглами.

14. Возьмите за боковые поверхности подписанное предметное стекло, опустите край стекла в воду и, подхватив срез, поместите его на стекло.
15. Предметное стекло со срезом поместите на термостолик, предварительно нагретый до 37-400.
16. Дождитесь, пока парафин на стекле со срезом расплавится, станет прозрачным и в нём появятся мелкие пузырьки (около 20-40 мин.).
17. Снимите стекло со срезом с термостолика. Теперь оно готово к депарафинизации и окраске гистологическими красителями.

Изготовление срезов требует от лаборанта мастерства и большой выдержки, усидчивости. Срезы могут не получаться из-за ошибок, допущенных на предыдущих этапах подготовки материала (таблица 3).

Таблица 3

Возможные погрешности при изготовлении срезов

Погрешность	Причина	Устранение

Срез крошится.	1. Твердый парафин. 2. Низкая температура воздуха. 3. Медленное охлаждение парафина при заливке. 4. Большой угол наклона ножа. 5. Объект плохо	1. Перезалить материал. 2. Дышать на поверхность блока или приспособить под блоком эл. лампочку. 3. Перезалить. 4. Изменить угол наклона.
Залитый материал выпадает из окружающей массы парафина.	1. При переносе объекта в формочку для заливки произошло его охлаждение. 2. Заливка произведена холодным парафином. 3. Недостаточное	1. Блок растопить и залить заново с соблюдением правил заливки. 2. То же. 3. Растопить и перенести
Плоскость среза неровная, материал не режется или режется плохо	Переуплотнение материала при проводке и фиксации.	Устранение невозможно.
Срезы	1. Малый угол наклона ножа.	1. Изменить угол

прилипают к поверхности ножа, мнутся.	2. Мягкий парафин. 3. Высокая температура воздуха.	2. Перезалить в более твердый; положить блок в краситель. 3. Сменить помещение, охладить нож.
Приклеивание к ножу или блоку срезов, сморщивание	Электризация.	Поместить на лезвие каплю воды. Дышать на нож и блок. Натирать лезвие и блок твердым
Срезы разрываются или покрыты бороздами.	1. Зазубрины на лезвие ножа. 2. Загрязненный парафин. 3. Материал плохо декальцинирован.	1. Точка, правка ножа или перемещение в ножедержателе. 2. Перезалить в чистый парафин.
Плоскость среза неоднородны.	Недостаточное обезвоживание.	Расплавление блока и проводка материала через промежуточные

Наиболее часто встречающиеся ошибки при работе с микротомом:

- неверно подобран угол наклона ножа;
- неправильно закреплен и подготовлен к резке блок;
- резкие движения;
- не заточен нож.

Микротом следует содержать в чистоте и регулярно смазывать трущиеся поверхности (направляющие станины, резьбовая часть микровинта, направляющая и трущиеся поверхности механизма подъема) вазелиновым маслом.

Замораживающий микротом-криостат (рис. 5) снабжен охлаждающей камерой с замораживающим столиком, на котором укрепляется исследуемый объект. Микротом- криостат используют для получения срезов нефиксированной ткани, а также в случаях, когда необходимо изучить объект в

короткий промежуток времени. Замороженные срезы часто используют для иммуногистохимических реакций, при этом необходимо избегать нагревания среза ткани, поэтому для замороженных срезов используют специальные предметные стёкла с Поли-Ь-лизиновым покрытием, обеспечивающие хорошую адгезию срезов тканей. Ниже приведён примерный порядок работы на микротом-криостате, однако подготовка аппарата к работе и процесс изготовления на нём замороженные срезов сложны, поэтому ознакомьтесь с инструкцией по применению микротом-криостата.

Порядок работы на микротом-криостате HM 550:

1. Подготовьте предметные стёкла, выложите 10-15 стёкол на лоток.
2. Подпишите стёкла простым карандашом (нанесите кодировку с блока на стёкла).
3. Включите сетевой выключатель на задней стенке прибора.
4. Закройте подогреваемое сдвижное окошко и охладите прибор.
5. В зависимости от установленной температуры камеры фаза охлаждения продолжается от 2 до 3,5 часов.
6. На дисплее включенного прибора появляется: предварительный выбор толщины срезов, температура образца и камеры с фактическими и номинальными значениями, символ окна для резания.
7. Выберете на дисплее настройку толщины среза (см. инструкцию), затем с помощью кнопок со стрелками введите необходимую толщину среза или толщину среза выравнивания.
8. Изменённые значения представляются на дисплее.
9. Фактические и номинальные значения охлаждения камеры и образца отображаются на дисплее в С 0.
10. Нажмите кнопку для температуры камеры (см. инструкцию), затем с помощью кнопок со стрелками выставите нужную температуру.
11. Нажмите кнопку для температуры образца (см. инструкцию), затем с помощью кнопок со стрелками выставите нужную температуру.

12. Установите тёплый предметный стол в отверстие на планке быстрой заморозки.
13. Нанесите на предметный стол замораживающее средство.
14. Положите ткань на ещё жидкое замораживающее средство.
15. Когда средство и ткань будут заморожены, можно вставить предметный стол в держатель образца и зафиксировать его там.
16. Ориентация образца относительно плоскости резания осуществляется с помощью ручки ориентации (см. инструкцию).
17. Установите нож:

- Отвинтите зажимные винты на зажимных пластинах.
- Откиньте антироллерную пластину вперёд с помощью вращения по часовой стрелке поворотной рукоятки, находящейся слева на держателе ножа.
- Ставьте нож.
- Положите на нож антироллерную пластину, поворачивая поворотную рукоятку против часовой стрелки.
- Затем притяните зажимные винты и зафиксируйте нож в этом положении.
    - Ослабьте рукоятку зажима для регулировки угла наклона ножа.
    - Поверните верхнюю часть держателя ножа так, чтобы получить необходимый угол наклона ножа (100 и больше).
    - Установленный угол наклона ножа считывается на шкале слева от держателя ножа.
- Поверните рукоятку зажима наверх, таким образом, установленный угол наклона ножа фиксируется в этой настройке.

18. Теперь образец можно резать.
19. Режущее движение микротома создаётся в результате вращения маховичка по часовой стрелке.
20. Для быстрого изменения расстояния между ножом и образцом существует грубая подача держателя образца с помощью соответствующей кнопки (см. инструкцию).
21. Убедитесь, что на дисплее предварительно выбрано значение толщины среза выравнивания.

22. Подача для выравнивания осуществляется путём вращения маховичка по часовой стрелке.
23. После выравнивания можно начинать делать серии срезов.
24. С помощью кнопки на дисплее выберите толщину тонких срезов, отрегулируйте значение.
25. Сделайте срезы, поворачивая маховичок по часовой стрелке.
26. Срезы перенесите на предметные стёкла.
27. После работы проведите чистку камеры от обрезков, оттаивание (должно включаться в автоматическом режиме, см. инструкцию).

Подготовка предметных и покровных стёкол для препаратов

В современных лабораториях обычно используют предметные стёкла хорошего качества, не требующие дополнительной обработки. Однако иногда приходится работать и с более простыми дешёвыми стёклами, которые перед использованием необходимо специально обработать, а именно, тщательно вымыть и обезжирить, и обработать поверхность специальными белоксодержащими смесями для приклеивания срезов (белок куриного яйца, плазма крови, раствор поли-Ь-лизина). Ниже приведена методика обработки таких стёкол.

Новые предметные стёкла следует прокипятить в 1% растворе соды, затем промыть дистиллированной водой, слабым раствором соляной кислоты (2,5% р-р) и вновь дистиллированной водой. ***Стёкла, бывшие в употреблении, кипятят в мыльной воде и затем не менее суток выдерживают в хромовой смеси***. После этого стёкла отмывают в проточной воде, ополаскивают дистиллятом и сушат. Стёкла хранят в смеси спирт-эфир (1 часть 95% этанола + 1 часть эфира).

Для отделения покровных стёкол от предметных следует использовать следующую смесь: 1 часть бутанола + 9 частей ксилола, где стёкла должны быть
герметично закрыты.

Состав хромовой смеси для очистки стёкол:

Дистиллированная вода - 100мл; бихромат калия - 6г; серная кислота (уд. вес -1,84) -100мл.

Бихромат калия растворяют в воде, после чего в раствор приливают серную кислоту.

После многократного использования тёмно-оранжевый цвет смеси меняется на тёмно-зелёный; такая смесь теряет свои моющие свойства. Хромовой смесью не следует мыть посуду, загрязнённую парафином, ксилолом и другими продуктами перегонки нефти. При работе с моющей смесью соблюдать предельную осторожность.

Предметные и покровные стёкла считают чистыми, когда капля воды растекается по их поверхности.

Для маркировки стёкол рекомендуется пользоваться карандашом на пришлифованной поверхности предметного стекла; специальными чернилами по стеклу; обычной тушью (после нанесения туши на стекло подпись следует прокалить на пламени).

Удобнее всего маркировать препараты простым карандашом на зашлифованном участке предметного стекла, т.к. эти надписи устойчивы к действию различных сред и, кроме того, их можно легко удалить резинкой. Можно использовать специальные чернила.

Чернила по стеклу:

Раствор А. 1г фуксина основного растереть в ступке с 15 мл этанола.

Раствор В. К 2 гр танина добавить 15 мл воды и нагреть до кипения.

Растворы смешивают в равных объёмах.

Приготовление и применение смеси для наклейки срезов

Состав: Белок - 1ч, глицерин - 1ч, тимол (фенол) - несколько крупинок.

Способ приготовления и применения. Тщательно и долго взбивать яичный белок до приобретения им жидкой консистенции, - после чего профильтровать через складчатый фильтр, смоченный дистиллированной водой (фильтровать лучше в холодильнике). Смешать с равным объёмом химически чистого глицерина. Для консервации смеси (во избежании порчи) бросить несколько крупинок тимола (фенола). Хранить в прохладном месте в банке с

притёртой пробкой.

На тщательно протёртое после смеси спирт-эфир предметное стекло нанести стеклянной палочкой небольшую каплю белка. Равномерно растереть её по поверхности стекла чистым сухим пальцем (избыток смеси удалить) и дать стеклу подсохнуть.

Наклеивание срезов на стекло

1. Срезы с микротомного ножа переносят в каплю воды на предметное стекло.

2. Предметное стекло подогревают на нагревательном столике или на пламени спиртовки для расплавления срезов.

3. Стекло маркируется и помещается в термостат для сушки при температуре 37°С на 24-48 часов.

Задание

1. Приготовить хромовую смесь.
2. Приготовить покровные и предметные стекла (очистить хромовой смесью).
3. Приготовить белковую смесь для наклейки срезов.
4. Подготовить балок к резке и приготовить парафиновые срезы.
5. Расправить срезы на нагревательном столике, используя препаровальные иглы.
6. Оформить результаты работы.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «СЕВЕРО- ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №5

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.

- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.
- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №5
ДЕПАРАФИНИРОВАНИЕ. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ: ГЕМАТОКСИЛИН-ЭОЗИН.

ЦЕЛЬ: Освоение методов депарафинирования, общих методов окрашивания.

Теоретические вопросы, подлежащие рассмотрению

1. Подготовка парафиновых срезов к окрашиванию. Общие принципы окрашивания. Обезвоживание и заключение срезов. Критерии качества изготовленных гистологических препаратов.

2. Гистологические красители. Классификация. Ядерные красители (гематоксилин, кармин, трифенилметановые основные красители).

3. Гистологические красители. Классификация. Цитоплазматические красители (эозин, эритрозин, пикриновая кислота, метиловый синий).

4. Методика окраски парафиновых срезов гематоксилином и эозином.

Для постановки гистохимической реакции или окраски гистологических срезов из последних следует удалить частицы затвердевающих сред. Срезы, полученные из парафиновых и целлоидин-парафиновых блоков, депарафинируют. Депарафинирование осуществляют в гистологических стаканчиках или стеклянных кюветах с пазами для стёкол с плотно притёртыми крышками. Следует строго соблюдать процедуру депарафинирования, так как ***неполное удаление парафина, целлоидина или поливакса вызывает артефакты морфологического или гистохимического характера.***

Схема депарафинирования:

Ксилол I - 1 мин.

Ксилол II - 1 мин.

95% этанол - 1 мин.

95% этанол - 1 мин.

Вода дистиллированная - 1 мин.

После каждого кювета стекло промокать фильтровальной бумагой.

Основные красители, применяемые в гистологических и гистохимических исследованиях

Необходимо отличать *краску* и *краситель.*

Первая окрашивает какой-либо объект в результате чисто физиологического процесса - передаёт материалу свой цвет. Краситель же вступает с объектом в сложный физико-химический процесс, в котором присутствуют и физические и химические явления. В конечном итоге результат

окрашивания зависит от сочетания свойств красителя (растворимость, окисляемость, размеры частиц и др.) и живой ткани (проницаемость, субмикроскопическая плотность, наличие свободной энергии, способность к реакциям присоединения, замещения, окисления и восстановления).

Красители принято разделять на:

I. Субстантивные

1) основные
2) кислые
3) нейтральные
4) индифферентные (лаки)

II. Адъективные

Субстантивные красители, или прямые, окрашивают непосредственно, без протрав.

Адъективные (аджективные), непрямые, при окрашивании объекта вначале осуществляют протраву ткани, а затем в результате соединения протравы с красителем образуется комплекс (лак), интенсивно окрашивающий объект.

Основные красители - это соли красящих оснований (содержат NH2-группу). Гистологические образования избирательно окрашиваются основными красителями - базофильны.

Кислые красители - свободные окрашенные кислоты или соли этих кислот (присутствуют группы SO2OH и COOH). Гистологические образования, окрашивающиеся кислыми красителями - оксифильны (ацидофильны).

Нейтральные красители - солеобразные соединения кислых и основных красителей. Ткани окрашиваются кислым (ацидофильный компонент) и основным (базофильный компонент ткани) элементами красителя.

Индифферентные красители - не обладают сродством ни к базофильным, ни к ацидофильным гистологическим образованиям. Окрашивание ткани основано на способности красителя растворяться в элементах ткани лучше, чем в растворителе. На этом основано применение Судана III и других красителей на липиды.

При анализе состояния определённых органов и тканей в качестве основных гистологических методов окрашивания применяют эозин-гематоксилин, железный гематоксилин Гейденгайна, окрашивание по ван Гизону, методы Маллори и др. Для постановки гистохимических реакций по выявлению нуклеиновых кислот, полисахаридов и липидов используют реакцию Фельгена, окраску конго-красным, ШИК-реакцию, окрашивание альциановым синим и др.

Окрашивание гематоксилином и эозином

Окраска гематоксилин и эозин - наиболее распространенный метод окрашивания срезов. В большинстве случаев для изучения структуры нормального или измененного в результате болезни органа ограничиваются этим методом окраски. В других случаях, когда перед исследователем стоит специальная задача, пользуются особыми методами, окрашивая в то же время параллельно ряд срезов гематоксилин и эозин.

Эта окраска является двойной: гематоксилин - основной краситель - окрашивает ядра клеток, эозин - кислый краситель - красит цитоплазму клеток и в меньшей степени - различные неклеточные структуры. Гематоксилин представляет собой экстракт древесины кампешевого дерева, произрастающего в Америке. Эозин - искусственная краска.

Растворы красителей должны быть приготовлены заранее.

Гематоксилин сам по себе не является красящим веществом. Для того чтобы приготовить краску, гематоксилин подвергают окислению, в результате чего он превращается в красящее вещество - гематеин. В соединении с некоторыми солями гематеин дает четкое окрашивание ядер.

Гематоксилин Эрлиха. Нужно растворить 2 г гематоксилина в 100 мл 95° спирта и к полученному раствору добавить воды дистиллированной 100 мл, глицерина чистого 100 мл, калийных квасцов 3 г, ледяной уксусной кислоты 10 мл.

Прибавлять эти вещества нужно в указанной последовательности. Калийные квасцы должны быть химически чистыми. Для того, чтобы

произошло полное окисление гематоксилина (т. е. чтобы образовался гематеин), приготовленный таким образом раствор должен не менее 15 дней находиться в светлом месте при доступе воздуха (для этой цели банка с раствором должна быть закрыта бумажным колпачком или сложенной в 2—3 раза марлей). О «созревании» раствора можно судить по его цвету: светло - красный сразу же после приготовления, он становится темно - красным через 15 дней. Раствор необходимо время от времени взбалтывать - это ускоряет его созревание. «Созревший» раствор квасцового гематоксилина Эрлиха можно очень долго сохранять в банках с притертыми или пришлифованными пробками.

Для изготовления этой краски можно пользоваться и непосредственно гематеином: растворяют в 100 мл 95° спирта 0,5 г сухого гематеина и далее добавляют указанные выше вещества в тех же количествах. Такой краситель можно употреблять сразу же, так как необходимость в «созревании» отпадает.

Существует много других рецептов приготовления краски из гематоксилина, однако основной принцип сохраняется: во всех случаях гематоксилин переводят в гематеин.

Гематоксилин Майера. Для его приготовления 1 г гематоксилина растворяют в 1 л дистиллированной воды и затем добавляют 0,2 г йодноватокислого натрия и 50 г калийных квасцов. Раствор помешивают чистой стеклянной палочкой до полного растворения, при этом он становится фиолетово-синим. После растворения прибавляют 50 г хлоралгидрата и 1 г кристаллической лимонной кислоты - раствор приобретает фиолетово - красный цвет. Такой раствор также сразу готов для употребления и не требует «созревания». Гематоксилин Майера долго сохраняется в посуде с притертой пробкой.

Гематоксилин Караци. Состав: вода дистиллированная (горячая) 400мл.; Квасцы

алюмо-каливые 25г.; Гематоксилин 0,5г.; 100мл.; Йодоватокислый калий глицерин (KJO3) 0,03г. Смесь готовится при
комнатной температуре и вначале представляет светло-фиолетовую жидкость, которая через несколько часов становится темновишневой и непрозрачной. В первые дни после приготовления краска дает слабое окрашивание срезов и

только спустя неделю приобретает достаточную красящую силу. Для предотвращения появления плесени добавляют немного тимола.

Созревшая краска хороша тем, что она не дает большого перекрашивания парафиновых и особенно целлоидиновых срезов даже при длительном пребывании в красителе.

Эозин - цитоплазматический краситель; используется он в виде спиртовых или, гораздо чаще, водных растворов. Для приготовления эозина 0,1 г краски растворяют в 100 мл спирта 95% (или дистиллированной воды).

Методика окраски:

1. Срезы из воды переносят в раствор красителя. Вполне созревший раствор

красителя обычно дает хорошие результаты через 2-3 минуты, однако продолжительность окраски зависит не только от самого красителя, но и от объекта, и может составлять до 1520 мин.

2. Начиная окраску, нужно на первых 2-3 срезах определить время окраски и

затем уже, строго придерживаясь установленного срока, красить все остальные срезы данного блока. Нужно только помнить, что во всех случаях, если краска зрелая, для получения хорошего окрашивания ядер требуется не более 5-6 минут.

3. Срез из гематоксилина переносят в *дистиллированную воду* и на предметном стекле контролируют при слабом увеличении микроскопа (а если необходимо, то и при сильном, накрыв срез предварительно покровным стеклом). Если окраска была удачной, ядра клеток имеют интенсивный красновато-фиолетовый цвет, в них отчетливо видны ядрышко и глыбки хроматина (при обычных, приведенных выше методах фиксации), цитоплазма клеток не окрашена. Если ядра имеют слабый фиолетовый цвет и в них не удается отчетливо видеть какие-либо структуры, следует увеличить время окраски. Когда ядра настолько сильно закрашены, что выглядят почти черными (красноватый оттенок сохраняется), внутриядерные структуры видны нечетко, а цитоплазма клеток имеет красновато-фиолетовую окраску, нужно уменьшить

время окраски.

4. Если гематоксилин окрашивает срезы очень быстро и даже при кратковременной обработке ядра резко перекрашиваются, применяют метод окраски с последующим ее ослаблением. С этой целью срезы красят несколько больше, чем нужно для получения нормальной окраски, т. е. заведомо перекрашивают. Для ослабления окраски срезы из воды переносят на несколько секунд в слабый раствор соляной кислоты в 70° спирте (5-6 капель крепкой соляной кислоты на 100 мл спирта). При этом усиливается красный оттенок. В большинстве случаев достаточно опустить срез в солянокислый спирт на 1 -2 секунды, чтобы ослабить окраску до желаемого тона.

5. Из гематоксилина или из солянокислого спирта срезы переносят на несколько минут в дистиллированную воду.

6. Далее следует промывка в воде с небольшим количеством щелочи. В
такой подщелочной воде срезы синеют через 20-30 секунд. Практически промывают срез в течение 10-15 минут (до его посинения) в водопроводной воде, которая всегда содержит следы щелочноземельных металлов и потому является слабо щелочной средой.

7. В результате промывания срезов в водопроводной воде цвет ядер становится интенсивно синим.

8. Окрашенные гематоксилином и промытые водопроводной водой срезы
переносят в дистиллированную воду на 3 - 5 минут. Для окраски цитоплазмы клеток срезы переносят на 0,5-2 минуты в раствор эозина. Продолжительность обработки здесь также зависит от самого объекта, фиксации и т. д., поэтому следует в каждом отдельном случае определить продолжительность окраски на нескольких срезах. При удачной окраске срез имеет равномерный желтовато-розовый цвет (само название этой краски происходит от греческого слова эос - заря), на фоне которого отчетливо выделяются окрашенные в синий цвет ядра. Если препарат имеет бледный розоватый или желтоватый оттенок, нужно увеличить время окраски. Если эозин все же плохо окрашивает срезы, его

можно подкислить уксусной кислотой (1 капля 3% уксусной кислоты на 100 мл раствора эозина). На перекрашенных препаратах общий фон интенсивно красный, ядра выделяются не резко, вся картина строения нечеткая - в этом случае сокращают время окраски или, если срез перекрашен не сильно, извлекают эозин при промывке водой.

9. Из раствора эозина срезы переносят на 1 минуту в дистиллированную

воду (для несколько перекрашенных срезов время промывки можно увеличить до получения желаемого тона) и, обезводив в спиртах, заключают через карбол - ксилол в канадский бальзам. Следует иметь в виду, что в спиртах окраска срезов эозином несколько ослабляется, поэтому проводить срезы до карбол - ксилола следует быстро.

Результат окраски:

Описанная двойная окраска гематоксилином - эозином является наиболее распространенным методом окрашивания ядер и фона - цитоплазмы и различных неклеточных структур. Существует много других ядерных и фоновых красок, которые в сочетании дают принципиально те же результаты.

Окрашивание железным гематоксилином по Гейденгайну

При этом методе ткани сперва протравливают в растворе железоаммонийных квасцов которые разными тканями воспринимаются с различной интенсивностью. При последующем действии гематоксилинового раствора образуется чёрный железно - гематеиновый лак, при последующей экстракции удерживаемый отдельными элементами тканей в разной степени.

Приготовление растворов.

А. Раствор железоаммонийных квасцов. Растворяют 10г светлофиолетовых квасцов в 100мл дистиллята. Этот раствор для использования разбавляют в различной степени. Жёлтые, выветрившиеся кристаллы не годятся.

Б. Раствор гематоксилина: 0,5г гематоксилина растворяют в 10 мл 95% этанола и разбавляют 90 мл дистиллированной воды. Раствор должен созревать 2 -4 недели при доступе воздуха. Перед использованием его разбавляют равным

количеством дистиллята. Если в запасе нет зрелого раствора, то с помощью NaJO3 можно вызвать его искусственное созревание (на 0,5г гематоксилина точно 0,1 г NaJO3).

Методика окраски:

1. Протравливание. Из дистиллированной воды срезы помещают в 6% раствор железоаммонийных квасцов - 3-12ч, при нормальных условиях (30мин - при 56ºС).
2. Промывка в дистилляте - 3-5мин.
3. Окрашивание гематоксилином (раствор Б - 1-36ч (30мин - при 56ºС).
4. Срезы промыть в дистилляте (3-5мин) и дифференцировать в растворе железных квасцов. В начале дифференцировки можно использовать 3-4% раствор, в конце - 0,5%. Время от времени степень дифференцировки контролируют, предварительно споласкивая срезы в большом количестве воды, чтобы прервать дифференцировку. Когда достигнута надлежащая степень окраски, срезы хорошо промывают в проточной воде или часто сменяемой - 15-60 мин.

Результат: учитываемые при дифференцировке структуры (хроматин, ядрышки, клеточные гранулы, митохондрии и др.) выступают отчетливо и контрастно. При последующей обработке препаратов, окрашенных железным гематоксилином, следует избегать эфирных масел, так как они повреждают окраску.

Дегидратация

После окраски проводят дегидратацию препаратов проводя их через серию спиртов возрастающей концентрации: 70% этанол - 3-5мин; 80% этанол - 3-5мин; 95% этанол - 3-5мин; 100% этанол (бутанол) - 3-5мин; Ксилол 1 - 3-5мин; Ксилол 2 - 3-5мин.

Заключение препаратов в консервирующую среду

Для дальнейшего изучения и фотографирования окрашенных препаратов их необходимо заключить в консервирующую среду. Для этих целей

используют канадский, пихтовый и кедровый бальзам, а в последнее время - различные синтетические смолы.

Свойства канадского бальзама:

1. показатель преломления близок к показателю преломления стекла;
2. отсутствие склонности к кристаллизации и помутнению при затвердении;
3. препараты могут храниться годами без заметного выцветания;
4. хорошо просветляет срезы и быстро высыхает.

Способы приготовления бальзама

Кусочки сухой смолы помещают в широкогорлый сосуд с пришлифованной пробкой. Наливают растворитель (ксилол) с таким расчетом, чтобы он покрыл смолу и оставляют до полного растворения при 37°С. Если возникнет консистенция жидкого меда, бальзам готов к использованию.

При отсутствии канадского бальзама, его можно заменить пихтовым, но качество препаратов получается хуже - может иметь место явление кристаллизации. Бальзам кедровый получают из живицы кедра сибирского. Твёрдая светло-желтая прозрачная масса. Температура размягчения 40-55°С. термостойкость 150°С. Обладает хорошими свойствами по морозостойкости, термостойкости и светостойкости.

Для препаратов, на которых изучают липиды, рекомендуются другие среды: глицерин, глицерин-желатин и др.

Правила заключения срезов в бальзам

1. Нанести на предметное стекло каплю бальзама и приставить к ней ребром покровное стекло.
2. Препаровальной иглой осторожно опустить покровное стекло.
3. Препаровальными иглами выжать пузырьки воздуха из под покровного стекла.
4. Следить за достаточным количеством бальзама под покровными стеклами. Сушить препараты в термостате при 37°С (до суток и более), можно при комнатной температуре.

Задание

1. Приготовить раствор гематоксилин Караци.
2. Приготовить раствор эозина.
3. Окрасить препараты гематоксилином - эозином.
4. Приготовить раствор железного гематоксилина.
5. Окрасить препараты железным гематоксилином по Гейденгайну.
6. Заключить препараты в бальзам

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №6

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.

- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №6
МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ: ПО МАЛЛОРИ

ЦЕЛЬ: Освоение метода окрашивания гистологических препаратов по Маллори.

Теоретические вопросы для рассмотрения на занятии

1. Методика окраски парафиновых срезов на выявление коллагеновых волокон по Маллори. Практическое значение.

Специальные методы окрашивания: окраска по Маллори.

Из большого числа методов, предложенных для окраски коллагеновых волокон, наиболее распространены: способ Ван-Гизон, оригинальный метод Маллори, метод Массона. Для достижения наилучших результатов при работе по указанным методам более всего показана фиксация кусочков в хромо-сулемовых жидкостях (жидкость Ценкера и ценкер-формол по Хеллн или Максимову). Можно пользоваться также формалином. Впрочем, формалин для

оригинального метода Маллори по сравнению с другими фиксаторами менее удовлетворителен и потому после него желательно дополнительное хромирование срезов с последующим промыванием в водопроводной воде.

Для окраски при всех вышеуказанных методах пригодны любые срезы, но лучше — парафиновые. Срезы чем тоньше, тем лучше.

Прежде чем перейти к изложению техники окраски по тому или иному способу, следует уточнить некоторые моменты, связанные с применением основного красящего вещества, а именно — анилинового синего.

Анилиновый синий (Anilinblau)—фенилрозанилин — не растворимая в воде и растворимая в спирте анилиновая краска синего цвета. В микроскопической технике применяются, главным образом, препараты анилинового синего, растворимые не в спирте, а в воде, получающиеся путем сульфурирования его и поступающие в лаборатории в виде солей натрия, аммония или кальция под различными наименованиями (Alkaliblau, Wasserblau, Methylblau, Chinablau, Bleu de Lyon). Растворимые в воде препараты анилинового синего в комбинации с кислым фуксином и оранжем используются в различных модификациях окраски по Маллори.

Оригинальный способ Маллори

Методика окраски:

1. Окрашивают срезы 0,1%-ным водным раствором кислого фуксина 2—3 минуты.
2. Быстро споласкивают в воде (лучше ограничиться только сливанием раствора фуксина).
3. Переносят (для фиксации фуксина) в 1%-ный водный раствор фосфорно- молибденовой кислоты на 2—5 минут (пользуются стеклянными иголками).
4. Быстро споласкивают в воде.
5. Окрашивают в свежепрофильтрованном красящем растворе следующего

состава:

Анилиновый синий (водорастворимый	0,5 г
Оранж G	2,0 г
Щавелевая кислота (кристаллическая)	2,0 г
Дистиллированная вода	100,0

Эту смесь нагревают до кипения, охлаждают и фильтруют.

Продолжительность окрашивания 1—2 минуты (следует избегать сильного перекрашивания).

6. Промывают в воде 0,5-1 минуту.

7. Дифференцируют в 95° спирте в течение нескольких минут (3—5 и более), контролируя под микроскопом, пока отчетливо выступят волокнистые структуры (коллагеновые волокна).

8. Проводят через абсолютный спирт, просветляют в ксилоле и заключают в бальзам.

Можно пользоваться для просветления срезов скипидаром и карбол-ксилолом.

Результат окраски: коллагеновые волокна — темно-синие; ядра, эритроциты и эластические волокна — красные; амилоид, гиалин и слизь — синие; мышечная ткань — оранжевая; неврог-лия н ганглиозные клетки — красновато-фиолетовые.

Окраску по Маллори можно комбинировать с литиевым кармином Орта. В таком случае срезы вначале окрашивают кармином (10—15 минут) и затем, не споласкивая в воде, дифференцируют в 1%-ном солянокислом спирте. После этого срезы хорошо промывают в воде и проводят окраску по Маллори.

Задание

1. Приготовить 0,1% раствор кислого фуксина.
2. Приготовить 1%-ный водный раствор фосфорно-молибденовой кислоты.
3. Приготовить красящий раствор по Маллори.

4. Окрасить препараты по Маллори.
5. Заключить препараты в бальзам.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №7

Тема

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.

- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.
- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №7

МЕТОД ОКРАШИВАНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПО ВАН-ГИЗОН

ЦЕЛЬ: Освоение метода окрашивания гистологических препаратов по Ван- Гизон

Теоретические вопросы, подлежащие рассмотрению

1. Методика окраски парафиновых срезов по Ван-Гизон. Практическое значение.

Окрашивание соединительной ткани и мышечной ткани по методу Ван-Г изон

Этот способ окраски имеет широкое применение, как и окраска гематоксилином и эозином. Для окраски по Ван-Гизон берут железный гематоксилин Вейгерта и в качестве кислой краски — пикрофуксин. Пикрофуксин как сложная кислая смесь в ряде случаев представляет преимущество перед эозином, ибо дает неодинаковое окрашивание различных

тканей. Процедура окраски по этому способу точно такая же, как и гематоксилин-эозином и классически ведется по простой схеме, т. е. без дифференцировки гематоксилина. Способ Ван -Гизон довольно капризный и требует известного технического опыта. Обычными дефектами его, при недостаточном навыке, являются бурые или зеленоватые ядра (вместо черных), темные или неравномерно окрашенные препараты и недостаточно элективная окраска различных тканей. Только хорошее знакомство с используемыми в данном способе красящими средствами позволяет получать удовлетворительные и хорошие результаты. Гематоксилин Вейгерта готовят по мере надобности (ex tempore) путем, смешивания равных объемов двух основных растворов, известных под названием «Вейгерт I и II». Правильно и удачно приготовленная красящая смесь должна быть темно-фиолетовой и обладать известной стойкостью, сохраняя свой первоначальный цвет около 40 минут.

Методика окраски:

1. Срезы перекрашивают в свежеприготовленном гематоксилине Вейгерта, выдерживая в нем 3—5 минут;
2. Основательно прополаскивают в двух порциях водопроводной воды, ввиду обильного отхождения краски;
3. Окрашивают в пикрофуксине 2—3 минуты; быстро прополаскивают в воде в течение 5—10—15 секунд;

4. Проводят через 95° спирт, повторно наливая и выдерживая в нем 1—2—3 минуты;
5. Просветляют в карбол-ксилоле, обрабатывают ксилолом и заключают в бальзам.

Гематоксилин Вейгерта

Раствор Вейргет I:

1% раствор гематоксилина в 950 спирте.

Раствор Вейргет II:

Официальный раствор полуторохлористого железа	4мл.
Крепкая соляная кислота (удельный вес)	1мл.
Вода дистиллированная	95мл.

(ООфициальный раствор полуторохлористого железа представляет собой 50% раствор водного хлорного железа FeCh 6H2O)

Пикрофуксин

Приготовить:

1) Насыщенный раствор пикриновой кислоты (в 100мл дистиллированной воды растворяют 1,2г. пикриновой кислоты).

2) 1% водный раствор кислого фуксина.

Оба раствора смешивают из расчета 10мл. пикриновой кислоты на 1мл. фуксина.

Пикрофуксин обладает дифференцирующим действием (за счет пикриновой кислоты) по отношению к железному гематоксилину, почему и допускается перекрашивание последним.

При окраске различных срезов пикрофуксином вначале следует приспособиться к нему для установления наиболее выгодных сроков окрашивания. Здесь очень важно пользоваться микроскопом, хотя бы для контроля первых препаратов. Так, например, если препараты получаются очень темными или в них определяются более темные участки на местах плохо отдифференцированного гематоксилина, то сроки пребывания срезов в пикрофуксине следует увеличивать до 5—10—15 минут, выжидая, пока препарат станет достаточно светлым, а окраска равномерной. Качество окраски в этом последнем случае контролируется под микроскопом, для чего срез повторно извлекают из пикрофуксина и быстро прополаскивают в воде.

Окраска ядер в бурый цвет, как уже было отмечено выше, связана с неудачным приготовлением железного гематоксилина.

Контролируя под микроскопом процесс дифференцировки, одновременно наблюдают и за тем, как окрашивает сам пикрофуксин. Если окажется, что разные тканевые структуры окрашиваются элективно, то препарат либо очень быстро (не более 5—10 секунд) промывают в воде, либо промывание в воде совсем пропускают и срез после пикрофуксина сразу обрабатывают 95° спиртом. Необходимость в быстром прополаскивании срезов в воде вызвана легкой растворимостью в ней кислого фуксина. Проводя срез через 95° спирт (с целью обезвоживания), одновременно используют в желательной мере и его извлекающую способность по отношению к пикриновой кислоте. Во избежание излишнего извлечения последней, рекомендуется обрабатывать окрашенные срезы не чистым 95° спиртом, а слегка подкрашенным пикриновой кислотой.

При замеченных дефектах окраски пикрофуксином, последний соответствующим образом подправляют, добавляя в него одну из составных частей красящего раствора.

При окраске по Ван-Гизон допускается и дифференцировка 1%-ным солянокислым спиртом. Она даже желательна при очень сильном перекрашивании железным гематоксилином и проводится точно так же, как это было описано для квасцовых гематоксилинов. Так как железный гематоксилин обладает более высокой красящей способностью по сравнению с квасцовыми, то и дифференцировка его солянокислым спиртом занимает больше времени (30—60 секунд).

Если дифференцировка солянокислым спиртом комбинируется с подщелачиванием промывной воды нашатырным спиртом, то последующее длительное промывание в воде (как это показано при окраске гематоксилин-эозином) необязательно, ибо пикрофуксин (точнее пикриновая кислота) нейтрализует щелочь. По понятным причинам продолжительность окраски в пикрофуксине для дифференцированных срезов должна быть значительно сокращена (до V2—1 минуты).

Способ Ван-Гизон дает наилучшие результаты с тонкими срезами и в первую очередь с целлоидиновыми; толстые замороженные выглядят очень

грубо и не всегда удовлетворительны.

Результат окрашивания: Этот способ особенно хорош для отличия гладкомышечной ткани от соединительной. Ядра клеток - чёрно-коричневые или фиолетово-чёрные; коллагеновые волокна - красно-чёрные; мышечная ткань, цитоплазма других клеток, клетки крови, кератин - жёлтые.

Окраска нестойкая, через несколько месяцев фуксин обычно исчезает и тогда препарат становится желтым.

Задание

1. Приготовить раствор красителя для окрашивания по Ван Гизон.
2. Окрасить препараты по Ван Гизон.
3. Читать препараты.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №8

Тема

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.

- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.
- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №8
МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

ЦЕЛЬ: сформировать представление о методах получения и исследования цитологического материала.

Теоретические вопросы для обсуждения на занятии

1. Объекты исследования цитологии. Этапы цитологического исследования.
2. Виды исследуемого материала. Способы получения материала для цитологического исследования.
3. Приготовление стёкол для получения мазков. Маркировка стёкол и флаконов с материалом. Фиксация цитологических мазков. Фиксаторы, их состав, время фиксации.
4. Методы окрашивания цитологических препаратов.
5. Оценка цитологической картины. Атипизм клеток. Признаки злокачественности клеток.

Значимость изучаемой темы

Цитологическое исследование (клиническая цитология) является одним из основных методов морфологического анализа клеточного и неклеточного биологического материала. Оно состоит в качественной и количественной оценке характеристик морфологической структуры клеточных элементов в цитологическом препарате (мазке) с целью установления диагноза различных заболеваний - доброкачественной или злокачественной опухоли и неопухолевых поражений.

На современном этапе развития клиническая цитология использует достижения эмбриологии, теоретической цитологии, нормальной и патологической гистологии, онкологии и других дисциплин и имеет своей целью распознание патологических процессов.

Цитологическая диагностика применяется: 1) в онкологии для распознавания злокачественных и доброкачественных опухолей; при массовых профилактических осмотрах с целью выявления ранних стадий опухолевого процесса и предраковых заболеваний; при наблюдении за ходом противоопухолевого лечения; 2) в гематологии для диагностики заболеваний и оценки эффективности их лечения; 3) в гинекологии — как с целью диагностики онкологических заболеваний, так и для определения беременности, гормональных нарушений и т.д.; 4) для распознавания многих заболеваний органов дыхания, пищеварения, мочевыделения, нервной системы и т.д. и оценки результатов их лечения.

Основным направлением клинической цитологии является, прежде всего, ранняя и своевременная диагностика новообразований.

Качество подготовки образцов биологических материалов для цитологических исследований регламентируется Методическими указаниями, утверждёнными зам. Министра здравоохранения РФ (Приложение 1).

Приготовление цитологического препарата

1. **Подготовка предметных стёкол для цитологического исследования.**

Стекла для приготовления цитологических препаратов должны быть чистые, обезжиренные и сухие.

2. Стекла тщательно промывают щеткой в теплой мыльной (или с моющим средством) воде.

3. Основательно промывают в проточной теплой воде.

4. Затем кипятят 1—2 часа в воде с добавлением соды (2—3%) или моющего средства.

5. После хорошо ополаскивают в чистой горячей воде и промывают в проточной (1—2 часа).

Обработанные и промытые в воде стекла протирают мягкой тряпкой, держа стекла за края, и хранят в смеси Никифорова (равные части 96° спирта и эфира). По мере надобности пинцетом извлекают стекла из смеси Никифорова и протирают сухой тряпкой. Обработанные таким образом стекла могут быть использованы для приготовления цитологических препаратов.

Для проведения цитохимических исследований очень хорошие результаты дает обработка предметных стекол и других стеклянных предметов в *хромовой смеси* следующего состава:

Двухромовокислый калий (бихромат калия) — 100 г; вода горячая — 1000 мл; неочищенная серная кислота — 100 мл.

Для приготовления хромовой смеси растворяют в горячей воде двухромовокислый калий, затем охлаждают раствор и после этого добавляют серную кислоту. Кислоту льют осторожно (обязательно в вытяжном шкафу), при этом смесь весьма сильно нагревается и приобретает темно-коричневый цвет. В этом составе предметные стекла и другую стеклянную посуду выдерживают 2—3 дня, а после промывают в проточной воде в течение 1—2 часов.

На хорошо обезжиренном предметном стекле вода должна растекаться тонким слоем, а не собираться в капли.

2. Получение цитологического мазка.

Полученное количество материала не всегда определяет возможности диагностики, иногда очень малое количество материала является достаточным для постановки диагноза. Наличие большого количества крови часто является помехой. При её наличии мазки необходимо делать как можно скорее, иначе наступает свертывание и из свернувшегося сгустка очень трудно сделать мазки и провести исследование.

Материал наносят на стекло и очень аккуратно делают мазки, т. к. клетки очень ранимы, а наличие большого количества разрушенных клеток мешает правильной диагностике.

Правильно приготовленный мазок из нормальной или патологической измененной ткани должен отвечать следующим условиям:

- Мазок должен начинаться на 1 см от узкого края предметного стекла и заканчиваться примерно в 1,5 см от другого края предметного стекла; мазок не должен достигать длинного края стекла, между мазком и краем предметного стекла должно оставаться расстояние примерно 0,3 см.

- Хороший мазок должен быть максимально тонким (максимально приближающимся к однослойному), равномерной толщины (не волнообразным) на всём протяжении.

- Мазок из осадка жидкого материала (жидкость из серозной полости, смыв из различных органов, содержимое кистозной полости и т.п.) должен заканчиваться у одного из узких краёв предметного стекла в виде следа, оставленного как бы тонкой щёткой.

- Клетки в мазке должны быть равномерно распределены, все участки мазка должны хорошо просматриваться и не содержать «толстые участки», содержащие непросматриваемые (плохо просматриваемые) скопления или комплексы клеток.

Из жидких пунктатов мазки готовят подобно мазкам крови, если полученная масса плотная или комковатая, то помимо мазков можно приготовить и отпечатки на стекле.

Метод отпечатков имеет определенные преимущества.

- Во-первых, клетки подвергаются гораздо меньшему травматизму.

- Во-вторых, есть возможность расположения клеток пластами, что помогает при описании цитологического препарата характеризовать и соотношение клеток между собой.

- В-третьих, если материал богат кровью, его необходимо нанести на стекло и тогда выбирать оттуда "беленькие крупинки" и ими делать мазки.

Метод отпечатков применим при использовании цитологического метода во время операционного вмешательства, а так же получении биопсии. Этот метод может быть использован, как самостоятельно, так и параллельно с гистологическим анализом. В этих случаях помимо пункций проводят получение отпечатков с удаленных или обнаженных органов, с помощью прикосновения стекла предметного к исследуемой ткани. Так же можно готовить препараты при получении материала методом соскоба.

Жидкости, полученные при пункции, тут же центрифугируют, далее сливают верхний слой из центрифуги, а из осадка делают мазки, которые и подвергают цитологическому исследованию. В некоторых случаях приготовленные препараты можно просмотреть под микроскопом, однако диагностику патологии необходимо проводить только по окрашенному препарату.

Для дифференциальной диагностики используют цитохимические методики. Чтобы установить характер секреции и межуточного вещества, используют окраски, применяемые в гистологии (мукармин для выявления слизи, окраска пикрофуксином для выявления коллагена, остеоида).

Если материала достаточно, клетки сохраненные, хорошо приготовлен и окрашен препарат, дается заключение о гистологической форме с указанием степени дифференцировки (низкодифференцированная аденокарцинома, плоскоклеточный ороговевающий рак). В тех случаях, когда материал и цитологическая картина недостаточно убедительна для установления конкретного диагноза, дается описание препарата, отдельных клеточных

элементов и, при возможности, их оценка.

Необходимой предпосылкой для точной оценки морфологических особенностей клеток в мазке является правильно сделанный, качественно фиксированный, хорошо окрашенный и методологически корректно изученный мазок, поступающий в лабораторию в сопровождении необходимых клинико-инструментальных и анамнестических данных. Невыполнение этих условий ведет к неправильному распределению клеток ткани, неполному выявлению их морфологических особенностей, «пропуску» важной диагностической информации на предметном стекле или отсутствию корригирующей клинической информации и, тем самым, к ошибочной оценке цитологической картины, а значит к неполноценному или ошибочного диагнозу. Если мазки были приготовлены вне лаборатории, то в соответствии с теми же требованиями оценивается их макроскопический вид. Сотрудники лаборатории должны постоянно обучать представителей клинических отделений, участвующих в приготовлении мазков.

3. Фиксация мазка.

Фиксация мазка проводится в соответствии с методикой,

обусловленной биологическим материалом, взятием для цитологического исследования (влажная фиксация биологического материала или подсушивание его на воздухе). При влажной фиксации приготовленный мазок помещается в фиксирующую жидкость, затем подсушиваем на воздухе. Недостаточная фиксация мазка ведет к некачественному окрашиванию клеток.

1. Правильная фиксация мазка обусловливает стойкость клеток по отношению

к содержащейся в красках воде, которая в нефиксированном мазке изменяет строение клеточных элементов. При фиксации мазка происходит коагуляция белка, в результате чего клетки прикрепляются к предметному стеклу;

2. При фиксации цитологических препаратов должны использоваться фиксаторы: метиловый спирт, этиловый спирт, смесь Никифорова, фиксатор Май- Грюнвальда, фиксатор Лейшмана, ацетон (для иммунноцитохимии).

Если это специально не оговорено методикой, то, как правило, фиксируют высушенные мазки. Лучшим фиксатором для цитологических препаратов является *метанол*. В метаноле фиксацию проводят от трех до десяти минут.

Кроме того, для фиксации может быть использован *этиловый спирт 100°*. Время фиксации составляет 10—30 минут.

В качестве фиксатора может использоваться *смесь Никифорова* (время фиксации минимум 15 минут, максимум 1—2 часа). Некоторые красители (Лейшман, Май- Грюнвальд) являются одновременно фиксаторами.

4. Окрашивание мазка.

Качественное окрашивание позволяет правильно идентифицировать клеточные элементы мазка и оценить их особенности при микроскопии. В адекватно окрашенном мазке структуры цитоплазмы, ядра, ядерного хроматина, ядрышек.

При применении любой методики окрашивание мазка важно точно соблюдать последовательность процедур приготовления растворов и временные промежутки времени в течение процесса окрашивания.

Существующие в продаже партии красителя имеют различную интенсивность окраски. Это обязывает опытным путём установить оптимальные концентрации (разведение) и время окрашивания для каждого флакона красителя, который устанавливает при окрашивании серии препаратов растворами с различной концентрацией красителя, меняя длительность его воздействия. При приготовлении растворов необходимо учитывать pH воды: она должна быть нейтральной (pH 6,8 - 7, 2) что обеспечивается использованием буферных растворов.

Рекомендуемые методы окрашивания цитологических мазков: азур - эозиновый, по Романовскому - Гимзе, Лейшману, Маю - Грюнвальду, Паппенгейму; гематоксилин - эозиновый, метод Папаниколау.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №9

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.

- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №9

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ: ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК РЕАКТИВОМ ШИФФА

ЦЕЛЬ: Освоение метода выявления ДНК реактивом Шиффа

Теоретические вопросы, подлежащие рассмотрению

1. Методика выявления ДНК реактивом Шиффа.

Метод выявления ДНК реактивом Шиффа

Метод предложен для изучения ДНК в ядрах клеточных элементов. Нуклеальная реакция Фельгена в срезах основана на кислотном гидролизе при температуре 60°, когда имеет место расщепление пурииодезоксипентозных связей ДНК. Благодаря такому расщеплению появляются свободные альдегидные группы, которые, соединяясь с реактивом Шиффа, образуют краситель красно-фиолетового цвета. ДНК локализована исключительно в ядрах и хромосомах. О состоянии ее судят как по интенсивности окраски ядра так и по количеству и величине определяемых в нем структур. При резких нарушениях в содержании ДНК ядро может представляться раздутым, пузырьковидным.

Для проведения нуклеальной реакции необходимы следующие реактивы:

нормальный раствор соляной кислоты на дистиллированной воде, фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа), сернистая вода (вода, содержащая SO2).

Приготовление растворов.

1. ***Нормальный раствор соляной кислоты на дистиллированной воде***.

В отношении соляной кислоты понятия нормальный раствор и молярный совпадают. Исходя из молекулярного веса HCl, равного 36,5, для приготовления молярного раствора следует взять ее в чистом виде (безводную) в количестве 36,5 г.

Известно, что максимально концентрированная соляная кислота имеет удельный вес 1,19 и содержит чистой кислоты (по весу) 37,3%. Следовательно, для приготовления нормального (молярного) раствора HCl нужно найти, в каком количестве такой крепкой соляной кислоты содержатся нужные нам 36,5 г. Решаем по следующей формуле:

$$100 : 37{,}3 = x : 36{,}5 = \frac{100*36{,}5}{37{,}3} = 97{,}8.$$

Таким образом, в 97.8 г исходной крепкой соляной кислоты содержится 36,5 г чистой (безводной) кислоты.

Переводя для удобства 97,8 г на объемную меру, получим 82 мл. Следовательно, для приготовления нормального молярного раствора HCl нужно взять 82 мл крепкой соляной кислоты удельного веса 1,19 и долить ее дистиллированной до 1 л.

2. ***Фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа***) 1 г растертого парафуксина (хлористоводородный пararозанилин) заливают 200 мл кипящей дистиллированной воды и растворяют при постоянном помешивании в течение 5 минут. Затем раствор охлаждают до 50°, фильтруют в банку с притертой пробкой и добавляют 20 мл нормальною раствора соляной кислоты. Раствор охлаждают до 25° и всыпают 1 г химически чистого бисульфита натрия.

Полученный раствор оставляют в темноте при комнатной температуре на сутки. За это время вследствие образования фуксинсернистой кислоты он или совершенно обесцвечивается, или приобретает желтоватый оттенок. Качество фуксина является решающим для получения обесцвеченного раствора фуксинсернистой кислоты.

Для приготовления фуксинсернистой кислоты нужно брать фуксин, специально для этого предназначенный. Применение простого основного фуксина ведет к неудачам, так как он неоднороден по своему составу и состоит из смеси солянокислых и уксуснокислых солей розанилина и пararозанилина, причем главной составной частью его является солянокислый розанилин (а не пararозанилин).

В темноте, при комнатной температуре и в хорошо закупоренной склянке реактив Шиффа может сохраняться до 4—6 недель. Если жидкость начинает окрашиваться (краснеть), она считается негодной к употреблению. Нельзя выставлять раствор фуксинсернистой кислоты на солнце, ибо в этом случае он быстро (в течение 15—30 минут) окрашивается в розовый цвет.

3. Сернистая вода. Берут 200 мл дистиллированной воды, прибавляют 10 мл 10%- ного раствора бисульфита натрия и 10 мл нормального раствора соляной кислоты. Сернистая вода каждый раз готовится свежая и должна обладать характерным запахом.

Реакция выявления ДНК обычно проводится на тонких парафиновых срезах, но можно пользоваться также замороженными и даже целлоидиновыми срезами; приклеивать их необязательно. Парафиновые срезы вначале, по общим правилам, освобождают от парафина, замороженные — предварительно выдерживают 24 часа в 95° спирте для удаления липоидного альдегида (плазмаля). Парафиновые и целлоидиновые срезы в такой спиртовой обработке не нуждаются. До проведения реакции срезы промываются в дистиллированной воде.

Материал фиксируют в жидкости Карнуа, Ценкера, хромо-формалиновых смесях (Рего, Орта, ценкер-формол), 10—15%-ном растворе нейтрального формалина и других жидкостях.

Качество фиксации имеет большое значение для результатов окраски. Различные фиксаторы дают наилучшую реакцию на ДНК при определенных сроках гидролиза, устанавливаемых опытным путем; гидролиз сверх определенного времени ведет к снижению реакции вплоть до полного ее исчезновения, что связано с потерей тканями ДНК и ее химическим расщеплением. Оптимальная продолжительность гидролиза при употреблении жидкостей Ценкера, Карнуа и ценкер-формола составляет 4—5— 8 минут, для 15%-ного формалина и жидкости Рего 6—15минут.

Методика проведения реакции.

Реакция проводится в 2 этапа:

1) гидролиз и 2) окраска фуксинсернистой кислотой.

Гидролиз. На асбестовую сетку ставят укрепленный на специальном штативе химический стаканчик емкостью около 100— 150 мл, в который наливают нормальный раствор соляной кислоты. В стаканчик ставят несколько предметных стекол с наклеенными на них (белком с глицерином) срезами, одновременно опускают в него и термометр, который укрепляется на штативе. Нагревают стаканчик на спиртовке до 60° и поддерживают эту температуру в течение 3 - 5 —8 минут.

Уровень соляной кислоты в стаканчике отмечают снаружи восковым карандашом для того, чтобы иметь возможность время от времени пополнять испарившуюся воду.

Для получения хороших результатов вначале надо отработать технику поддержания температуры па указанном уровне с допустимыми колебаниями температуры в пределах 1—2° (от 59 до 61°). Проще вести эту реакцию на водяной бане или еще лучше и термостате, установленном на 60°, в хорошо закрытом стаканчике.

По истечении 3-5-8 минут, для прекращения гидролиза, препараты вынимают из стаканчика, опускают в холодную воду и затем быстро ополаскивают в холодном нормальном растворе соляной кислоты.

Окраска.

1. Помещают срезы в закрытый сосуд с фуксинсернистой кислотой

(реактив Шиффа) на 1—2 часа. Окрашивание ведут в темноте!!!

2. Тщательно промывают в 3 порциях сернистой воды (налитой в стаканчики, прикрытые крышками) по 2 минуты в каждой порции. Препараты проводят в одной и той же последовательности и, таким образом, первый стаканчик принимает больше всего фуксинсернистой кислоты.

3. Промывают в дистиллированной воде 5—10 мин.

4. Проводят через спирты, ксилол, бальзам.

Результат окрашивания: ядерное вещество окрашивается в красно-фиолетовый цвет.

Для большей уверенности в результатах реакции желательно ставить контрольный опыт, который состоит в том, что один из срезов, не подвергая гидролизу, посте кратковременного пребывания в холодном нормальном растворе соляной кислоты помещают в раствор фуксинсернистой кислоты (на 1—2 часа). Ядерное вещество в этом случае остается неокрашенным.

Задание

1. Приготовить растворы для окраски препаратов.
2. Окрасить препараты.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №10

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.

- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ№ 10

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ: ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ С ПОМОЩЬЮ ШИК- РЕАКЦИИ; МУКОПОЛИСАХАРИДОВ АЛЬЦИАНОВЫМ СИНИМ

ЦЕЛЬ: Освоение метода выявления полисахаридов с помощью шик-реакции; мукополисахаридов альциановым синим

Теоретические вопросы, подлежащие рассмотрению

1. Методика выявления полисахаридов с помощью шик- реакции.
2. Методика выявления полисахаридов альциановым синим

Выявление полисахаридов с помощью реакции Шифф-перйодной кислоты

(ШИК— PAS-реакция).

С помощью этой реакции могут выявляться гликоген, мукопротеиды, гликопротеиды и гликолипиды. В результате окисления в перйодате возникают альдегидные группы, которые связываются с реактивом Шиффа и дают лилово-красное окрашивание. Материал можно фиксировать в спирте, формалине, по Лилли и в других фиксаторах.

Приготовление рабочих растворов.

Растворы перйодатов готовят на дистиллированной воде. Для этого в 100

мл воды растворяют 1 г перйодата калия или 2,5 г перйодата натрия.

С приготовлением реактива Шиффа Вы уже встречались на прошлом занятии при выявлении ДНК реактивом Шиффа. Ниже приведена пропись приготовления реактива Шиффа по Тимози, которая имеет некоторые отличия от ранее приведённой прописи.

1. Реактив Шиффа по прописи де Томази: 1 г основного фуксина тщательно перемешать в фарфоровой ступке и растворить в 200 мл кипящей дистиллированной воды, 5 минут встряхивать и охладить точно до 50°С. Профильтровать. К фильтрату добавить 20 мл 1 н. раствора соляной кислоты. Раствор охладить до 25°С и прибавить к нему 1 г метабисульфита натрия (калия) - Na2S2Os. Раствор оставить в течение 14-24 ч. После этого добавить 2 г активированного угля, 1 минуту встряхивать. Профильтровать. Хранить в холодильнике при 0 - +4°С. Перед использованием раствор должен иметь комнатную температуру.

2. Сернистая вода: Берут 200 мл дистиллированной воды, прибавляют 10 мл 10%- ного раствора бисульфита натрия и 10 мл нормального раствора соляной кислоты. Сернистая вода каждый раз готовится свежая и должна обладать характерным запахом.

После окисления в перйодате срезы необходимо тщательно промыть в дистиллированной воде, чтобы на них не было коричневого осадка. Окрашивание обычно проводят в стаканчиках с притертой пробкой и обернутых черной бумагой. После работы реактив Шиффа следует поставить в холодильник.

Методика проведения реакции.

1. Депарафинированные срезы через ряд спиртов доводят до воды.
2. Переносят в перйодат натрия или калия на 20-30 минут.
3. Тщательно промывают в дистиллированной воде.
4. Помещают на 10-15 минут в реактив Шиффа.
5. Ополаскивают в трех порциях сернистой воды.
6. Промывают в дистиллированной воде.
7. Обезвоживают, просветляют и заключают в бальзам.

Результат окрашивания: ШИК - положительные вещества окрашиваются в красный цвет различных оттенков. Нейтральные мукополисахариды бывают обычно пурпурно-красные, гликоген - более темный.

Модификация методики проведения ШИК— PAS-реакции

1. Депарафинированные срезы через ряд спиртов доводят до воды.
2. Окисление в 0,5% растворе йодной кислоты 3-5мин. (500мг. йодной кислоты на 100мл. дистиллированной воды). Окисление проводят в темноте!
3. Тщательно промывают в дистиллированной воде 10мин (3 смены воды).
4. Помещают на 10-15 минут в реактив Шиффа (в темноте!).
5. Ополаскивают в трех порциях водопроводной воды.
6. Подкрашивают в гематоксилине.
7. Промывают в водопроводной воде.
8. Обезвоживают, просветляют и заключают в бальзам.

Задание

1. Приготовить растворы для модифицированной ШИК - реакции.
2. Окрасить срезы с помощью ШИК - реакции (модификация).

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №11

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.

- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №11

Методы иммуногистохимических исследований.

ЦЕЛЬ: сформировать представление о иммуногистохимических методах исследований.

Теоретические вопросы для обсуждения на занятии

1. Принципы иммуногистохимических методов.
2. Иммунофенотипирование и иммуногенотипирование при анализе клеточной принадлежности и функционального состояния.
3. Применение флуоресцентной микроскопии для визуализации гистохимических реакций.

Значимость

При некоторых патологических состояниях (особенно опухолях) бывает трудно и даже невозможно с помощью гисто- или цитологических окрасок определить тип ткани либо ее происхождение (гистогенез). Между тем такая верификация имеет важное значение для диагностики и прогнозирования. Поэтому используют различные дополнительные методические подходы. Одним из них является иммуногистохимический метод: на гисто- или цитологические препараты наносят растворы с антителами к искомым

антигенам: опухолевым, вирусным, микробным, аутоантигенам и др. Антигены при обычных гистологических окрасках тканей не видны. Антитела в сыворотках несут на себе метку: либо флюорохром, т. е. краситель, светящийся в темном поле (иначе говоря, дающий флюоресценцию), либо красящий фермент. Если искомый антиген есть в исследуемых тканях или клетках, то возникший комплекс антиген-антитело плюс маркер точно укажут его локализацию, количество, помогут изучить некоторые свойства.

Иммуногистохимия - это метод выявления и точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) in situ с помощью иммунологических и гистохимических реакций. Иммуногистохимические методики исследования на сегодняшний день являются обязательной частью любых исследований, т.к. только они обеспечивают специфическую визуализацию тех или иных веществ.

С помощью данной методики можно определять локализацию в тканях различных клеточных продуктов (гормонов, ферментов, иммуноглобулинов), компонентов клеток (рецепторов, сократительных и промежуточных филаментов) и даже отдельных генов.

Практическая часть

1. Подготовка клеток и тканей

Выявление антигенов в клетках и тканях с помощью иммуногистохимии осуществляется в несколько этапов. Исследуемые образцы замораживаются или заключаются в парафин, режутся на микротоме и помещаются на предметные стекла. Затем срезы освобождаются от парафина, на них проводят демаскирование антигенов, блокируют неспецифическое связывание белков и эндогенную пероксидазную активность и затем проводят инкубацию с первичными антителами. Связавшиеся первичные антитела выявляют, добавляя вторичные антитела, конъюгированные при помощи полимера с пероксидазой хрена, и осуществляют визуализацию вторичных антител при помощи субстрата - диаминобензидина. После достижения максимальной

интенсивности окрашивания, срезы промывают водой для прекращения реакции, докрашивают гематоксилином и заключают в заливочную среду.

Для ИГХ пригоден практически любой материал: цитологические мазки, свежезамороженная или фиксированная ткань. Выбор исследуемого материала должен определяться свойствами изучаемого антигена: так, большинство цитоплазматических антигенов выявляются на фиксированных формальдегидом и залитых в парафин срезах; поверхностные клеточные антигены, как правило, разрушаются или маскируются при обычной фиксации и могут быть выявлены только на свежезамороженных тканях либо в культуре клеток.

2. Фиксация

Основная часть гистологических и цитологических методик направлена на сохранение морфологической структуры клеток и тканей, для этого исследуемые образцы помещают в фиксирующие растворы. Фиксация необходима для предотвращения аутолиза антигенов; при этом блокируются лизосомные ферменты и предотвращается рост бактерий, которые вызывают разрушение клеточной структуры.

Положительный результат иммуногистохимической реакции во многом определяется адекватной фиксацией исследуемых антигенов в тканях. Выявляемый антиген должен быть нерастворимым в жидкостях за счет процесса фиксации его к тканевым компонентам. Особенностью антигена является доступность его первичной структуры для антител. С другой стороны, за счет денатурации белков, фиксация вызывает структурные изменения и инактивацию антигенного профиля клеток. Идеальный фиксатор должен сохранять морфологию исследуемого материала, закреплять исследуемый антиген в месте его распределения и не нарушать его антигенные свойства. До настоящего времени подобного фиксатора не описано.

Выбор специфического фиксатора для отдельных компонентов клетки имеет большое значение. Из этих компонентов важную роль играют белки клетки, а лучшим для них фиксатором является формалин; в тех случаях, когда формалин использовать нельзя, его обычно заменяют спиртом или ацетоном. В

частности, антигены промежуточных филаментов лучше выявлять на свежезамороженных срезах или тканях, фиксированных в спиртах.

Фиксация мазков крови и цитологических препаратов. Перед фиксацией препараты высушивают 1-2 часа при комнатной температуре для предотвращения повреждения клеток. При высушивании клетки плотно прилипают к стеклу и не смываются при последующей фиксации. Высушивание не повреждает структуры поверхностных антигенов лейкоцитов. Мазки фиксируют либо в абсолютном ацетоне, либо в 96° этаноле 1-3 мин, с последующей окраской клеток.

3. Приготовление срезов тканей

Иммуногистохимия на криостатных срезах. Криостатные срезы подходят для выявления большинства антигенов. Срезы толщиной 5 мкм помещают на покрытые поли- L-лизином стекла и высушивают в течение 12 часов при комнатной температуре. Срезы фиксируют, погружая в холодный ацетон -20 °С, либо другой фиксатор (этиловый спирт, формалин и т.п.) на 2 мин. Стекла высушивают на воздухе и проводят регидратацию в 1% неиммунной бычьей сыворотке в солевом фосфатном буфере (PBS), затем осуществляют иммуногистохимическую реакцию.

Иммуногистохимия на парафиновых срезах. Современные методы демаскирования клеточных антигенов позволяют проводить ИГХ реакции на парафиновых срезах. При этом в качестве фиксатора может быть использован 10% раствор забуференного формальдегида.

<u>Заливка в парафин:</u>

1. Фиксация в забуференном формалине - сутки.
2. Промывка в проточной воде - 2 часа.
3. 70% этанол - 30 мин.
4. 80% этанол - 30 мин.
5. 90% этанол - 30 мин.
6. 100% этанол - 3 смены по 1 часу.
7. Ксилол/ этанол 1:1 - 15 мин.
8. Ксилол - 2 смены по 30 мин.

9. Ксилол/ парафин 1:1 при 56?С - 30 мин.
10. Парафин - 2 смены при 56?С 1 час.
11. Заливка.

Перед проведением ИГХ реакции на парафиновых срезах необходимо осуществить их регидратацию. Срезы толщиной 4-5 мкм режутся на покрытые поли-Ь-лизином стекла, затем высушиваются при 37?С в течение ночи и 1 час при 60 °С.

Регидратация:

1. Ксилол - 3 смены по 5 мин.
2. 100% этанол - 2 смены по 3 мин.
3. 96% этанол - 2 смены по 3 мин.
4. 80% этанол - 3 мин.
5. Дистиллированная вода - 2 смены по 3 мин.

Демаскирование антигенов

После фиксации в формалине и заливки в парафин тканевые антигены необходимо демаскировать. Эта процедура направлена на восстановление оригинальной структуры белка. Методы демаскирования антигенов, такие как обработка протеолитическими ферментами или нагревание в микроволновой печи после формалиновой фиксации и заключения в парафин способствуют обнаружению не выявляемых ранее антигенов.

Демаскирование клеточных антигенов ферментами (трипсин, протеиназа К, проназа) применяется, как правило, для цитокератинов и некоторых других клеточных антигенов. Другой способ «освобождения» антигенов осуществляется путем нагревания, при этом отмечается усиление иммуногистохимической реакции на срезах, фиксированных в формалине. Для нагревания можно использовать как водяную баню, так и микроволновую печь. Как правило, нагревание срезов проводят в 10 мМ цитратном буфере при pH 6,0.

Протокол обработки срезов ферментами:

1. Поместить срезы в дистиллированную воду.
2. Приготовить 0,1% раствор трипсина или протеиназы К в PBS (pH

7,6).

3. Инкубировать при 37 °С от 15 до 60 мин.
4. Остановить действие фермента ополаскиванием в холодной воде.
5. Перенести в PBS.

Протокол обработки срезов в микроволновой печи:

1. Поместить срезы в пластиковый контейнер с 10 мМ цитратным буфером (pH 6,0).
2. Нагревать срезы при мощности 700 Вт 7 мин.
3. Долить испарившуюся жидкость и нагревать срезы при мощности 350 Вт 20 мин.
4. Остудить срезы вне печи в течение 15 мин.
5. Перенести срезы в PBS.

4. Блокировка эндогенной активности ферментов

Эндогенная активность пероксидазы. Пероксидазная активность встречается во многих клетках организма: эритроцитах (гемоглобин), миоцитах (миоглобин), макрофагах и нейтрофилах (цитохромы), гепатоцитах и эпителии почек (каталаза). Для нейтрализации эндогенной пероксидазной активности на срезы на 10 мин наносят 1-3% раствор перекиси водорода.

Эндогенная активность щелочной фосфатазы. Блокирование щелочной фосфатазы осуществляют 5 мМ раствором левамизоля.

Биотин. Витамин Н - биотин - присутствует в печени, почках и др. органах. При использовании по время ИГХ реакции пероксидазно-авидинового комплекса для визуализации меченых биотином вторичных антител, возможно его неспецифическое связывание с клеточными компонентами, содержащими эндогенный биотин. Для предотвращения подобной неспецифической реакции перед осуществлением блокирования эндогенной пероксидазы проводят инкубацию срезов в 0,1% р-ре авидина, а затем в 0,01% растворе биотина в Трис-буфере (ТБС). Второй способ избежать неспецифической реакции с биотином - это использование современных безбиотиновых систем

визуализации антигенов.

5. Проведение иммуногистохимической реакции

Существует множество различных методов иммуноферментной окраски, которые позволяют определить место локализации антигена: прямой метод, непрямые методы, методы с использованием ферментных иммунных комплексов, авидин-биотиновые методы и др.

Прямой метод. Эта методика была разработана A.H. Coons, M.H. Kaplan (1950). Меченые ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианатом) первичные антитела наносили непосредственно на срезы. После инкубации несвязанные антитела смывали фосфатным буфером и с помощью ультрафиолетового света выявляли места локализации антигенов по зеленоватой флюоресценции.

Непрямой метод. Был также описан A.H. Coons с соавт. (1955). Этот метод более чувствителен, чем прямой, т.е. то же количество первичных антител, присоединенных к тканевым антигенам, будет более интенсивно окрашиваться по сравнению с прямым методом либо то же количество антигенов можно локализовать за счет более низкой концентрации первичных антител. Первичные немеченые антитела наносят на срезы, а их избыток смывается буфером. Затем наносятся вторичные конъюгированные с ФИТЦ антитела, принадлежащие другому виду животных, полученные к гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови животных, использовавшихся в качестве первичных антител. В этом случае первичные антитела, связавшиеся с антигенами исследуемой ткани являются антигенами для меченых вторичных антител, которые также распределяются в месте локализации тканевых антигенов. Другим преимуществом непрямого метода является возможность применения одних и тех же меченых вторичных антител, при использовании первичных антител от одного и того же вида животных. Маркеры для этого метода могут быть флуоресцентными (флуоресцин, родамин), ферментными (пероксидаза хрена), а также коллоидное золото.

Не конъюгированный антигенно-ферментный метод. Название связано с тем, что как первичные, так и вторичные антитела не конъюгируются с маркерами. В свою очередь, вторичные антитела используются как мостик

между первичными антителами и конечными, которые также не конъюгируются, а получаются путем иммунизации животных того же вида, что и первичные антитела к пероксидазе хрена. За последним слоем антител наносится пероксидаза хрена, которая присоединяется путем реакции антиген-антитело и затем проявляется гистохимически. За счет отсутствия химической конъюгации, не повреждается иммунологическая реактивность всех антител.

Одиночный мост. Первым слоем может быть кроличья сыворотка, полученная против первичного антигена, второй слой - неконъюгированная сыворотка козы против кроличьих гаммаглобулинов и третий слой - кроличья сыворотка, полученная против пероксидазы хрена, которая затем проявляется гистохимическим методом, таким как диаминобензидин и перекись водорода по R.C. Graham и M.J. Karnovsky (1966).

Двойной мост. Он включает повторение второго слоя, сыворотки козы против кроличьих иммуноглобулинов после кроличьей антипероксидазной сыворотки и затем повторение кроличьей антипероксидазной сыворотки перед нанесением пероксидазы и её визуализацией, таким образом достигается увеличение числа мест, связывающих пероксидазу.

Пероксидазно-антипероксидазный метод. Развитие этого метода L.A. Sternberger (1979) оказало большое влияние на иммуногистохимию. Модификация Штейнбергом мостовой методики заключалась в проведении реакции антипероксидазных антител с пероксидазой перед нанесением их на ткани. Эта реакция приводила к образованию стабильного комплекса трех молекул пероксидазы хрена с двумя молекулами антител. Этот комплекс отделялся от непрореагировавших антител и пероксидазы перед использованием. Он реагирует как антиген третьего слоя. Первый слой составляют кроличьи антитела, реагирующие с тканевыми антигенами, второй слой образует неконъюгированная вторичная сыворотка козы против кроличьих антител в избытке, таким образом одно из парных соединительных мест антител (Fab-часть) является свободной для реагирования с третьим слоем кроличьего ПАП комплекса. Таким образом, обеспечивается высокое соотношение между количеством пероксидазного маркера и первичным антигеном. Кроличьи ПАП

молекулы реагируют только с антикроличьими иммуноглобулинами козы второго слоя, и это обеспечивает отсутствие неспецифического связывания с тканью. Это специфичная и свободная от фона реакция. Для увеличения интенсивности, нанесение второго и третьего слоев можно повторить.

Авидин-биотиновый метод. Два новых вещества стали использовались в иммуногистохимии после исследований J.L. Guesdon с соавт. (1979) - биотин и авидин. Биотин (витамин Н) в большом количестве содержится в белках птичьих яиц, где он связан с большим гликопротеидом - авидином. Авидин имеет высокую аффинность к биотину, одна его молекула может присоединить 4 молекулы биотина. Биотин может связываться с Fc-иммуноглобулинами, каждая молекула биотина имеет одно место связывания, но с одной молекулой иммуноглобулина могут связываться несколько молекул биотина. Как биотин, так и авидин могут быть помечены флуоресцентной меткой, ферментом, ферритином или молекулой золота. Методика с использованием авидин-биотиновых комплексов считается соответствующей либо даже превышающей ПАП метод по чувствительности. В этой методике первый слой представляют первичные кроличьи антитела; второй слой составляют биотинилированные антикроличьи иммуноглобулины козы; третий слой представлен авидин-биотиновым комплексом. Авидин реагирует с биотинилированной пероксидазой хрена в такой пропорции, при которой три связывающих места авидина взаимодействуют с биотинилированной пероксидазой, оставшееся одно место на каждой молекуле является свободным для взаимодействия с биотином второго слоя антител. Метод блокирования неспецифического взаимодействия с тканевым биотином был предложен G.S. Wood и R. Warnke (1981). Неконъюгированный авидин наносится на ткани для связывания биотина и затем добавляется в избытке неконъюгированный биотин для предупреждения любого связывания авидин-биотинового комплекса.

В последнее время различными фирмами разработаны ***новые методы визуализации иммуногистохимической реакции*** с использованием конъюгатов полимеров. К длинной молекуле полимера присоединяется большое количество фермента. За счет увеличения концентрации фермента

повышается чувствительность метода. При этом с полимером могут быть конъюгированы как первичные антитела, так и молекулы фермента EPOS (Enhanced Polymer One Stepstaining) фирмы Dako. Если с молекулой полимера конъюгируются вторичные антитела и фермент (EnVision, фирмы Dako), то иммуногистохимическая реакция проводится в два этапа, при этом достигается высокая чувствительность по сравнению с другими методами визуализации.

Наибольшую популярность в настоящее время получили иммуногистохимические методики, использующие для визуализации реакции ферменты пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу, с использованием стрептовидинбиотинового комплекса. Эта методика проводится в три этапа: нанесение неокрашенных первичных антител, затем биотинилированных вторичных антител и добавление связанного с молекулами фермента стрептовидина (Dabbs D.J., 2002). Необходимо отметить, что чувствительность ИГХ методики во многом зависит от используемых реагентов и особенностей проведения реакции, в связи с чем, сложно сравнивать результаты ИГХ при использовании различных реактивов и методических приемов.

Важными условиями проведения иммуногистохимической реакции является подбор титра антител. Титром антител называют максимальное разведение сыворотки, при котором наблюдается выраженное специфическое окрашивание без неспецифического фонового окрашивания окружающих тканей. Все коммерческие антитела имеют инструкции с описанием оптимального разведения, однако часто подбирать титр антител приходится экспериментально, поскольку этот показатель зависит от таких причин, как длительность инкубации первичной сыворотки, окружающая температура, выбранная система визуализации распределения первичных антител и т.п.

Перед нанесением первичных антител срезы помещают на 1-2 мин в PBS, затем необходимо удалить избыток буфера вокруг среза и капнуть на срез небольшое количество первичной сыворотки от 30 до 50 мкл в зависимости от площади среза. Затем срезы помещают горизонтально во влажную герметичную камеру на подставку, под которой находится фильтровальная бумага, смоченная водой, для предотвращения неспецифического связывания антител с тканью за

счет их высыхания. И проводят инкубацию при комнатной температуре в течение 15-30 мин в зависимости от рекомендаций производителя антител. Для ускорения процессов связывания антител с антигенами можно проводить инкубацию при температуре 37?С. Для повышения интенсивности ИГХ реакции и увеличения разведения используемой сыворотки можно проводить реакцию при 4 °С в холодильнике в течение ночи.

Протокол иммуногистохимической реакции, предлагаемый компанией Dako.

1. Приготовить парафиновые срезы на стеклах, покрытых поли-Ь-лизином, провести депарафинирование и регидратацию в TBS (Dako TBS, S196830, добавить 0,05% Tween 20).
2. Удалить избыток жидкости вокруг срезов и капнуть 1% р-р перекиси водорода 10 мин.
3. Промыть в TBS.
4. Удалить избыток жидкости вокруг срезов.
5. Нанести первичные антитела (мышиные или кроличьи). Инкубировать 30 мин при комнатной температуре во влажной камере.
6. Промыть в TBS.
7. Удалить избыток жидкости вокруг срезов.
8. Нанести вторичные антитела (смесь антимышиных или антикроличьих биотинилированных антител). Инкубировать 15-30 мин при комнатной температуре во влажной камере.
9. Промыть в TBS.
10. Удалить избыток жидкости вокруг срезов.
11. Нанести конъюгированный с пероксидазой стрептавидин. Инкубировать 1530 мин при комнатной температуре во влажной камере.
12. Промыть в TBS.
13. Удалить избыток жидкости вокруг срезов.

14. Провести гистохимическое выявление пероксидазной активности с раствором диаминобензидина 5-10 мин.
15. Промыть в воде.
16. Докрасить ядра гематоксилином Майера 1-2 мин.
17. Промыть срезы в проточной воде.
18. Провести дегидратацию в восходящей батареи спиртов.
19. Заключить срезы в канадский бальзам.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

Учебная дисциплина: **«проведение гистологических исследований»**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №12

Цели занятия:

Образовательные:

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

Развивающие:

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

Воспитывающие:

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.

- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.
- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

Тип занятия: сообщение новых знаний.

Вид зянятия: практическое занятие.

Метод обучения: методика актуализации знаний.

Форма организации: групповая.

Средства технической поддержки работы: таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

ЗАНЯТИЕ №12

Методы количественного анализа клеточных структур

ЦЕЛЬ: сформировать представление о методах анализа клеточных структур.

Теоретические вопросы для обсуждения на занятии

1. Методы количественного анализа клеточных структур.
2. Морфометрические индексы, применяемые для оценки функционального состояния клеток.
3. Методы качественного анализа клеточных структур.
4. Применение систем визуализации и архивации изображений.

Значимость

Морфологический метод изучения основан на оценке фиксированных, статичных моментов, соответствующих определённому состоянию органа. Это создаёт определённые трудности в формировании целостных представлений о структуре органа, поскольку не всегда можно точно определить степень, направление и закономерности наблюдаемых структурных изменений. С целью уточнения закономерностей строения применяется морфометрический анализ. Морфометрический анализ не только увеличивает точность описания

изучаемой структуры, но и значительно усиливает логику выводов, сделанных на основе изучения морфологической картины.

Практическая часть

Морфометрия

Получите фотоснимки гистологических препаратов почки с использованием микроскопа Axio Imager. Z1 (Zeiss, Германия).

Используя программу AxioVision 4.6.3., проведите морфометрию структур почки в полученных изображениях.

Для этого измерьте: площади эпителия, полостей в эпителиальных структурах, сосудов, мезенхимы в срезе мезонефроса (объектив: 40; окуляр: 10); минимального диаметра канальца и просвета канальца в разных отделах нефрона (объектив: 40, 100; окуляр: 10); максимального и минимального диаметров ядра клетки проксимального и дистального канальцев, висцерального и париетального листков капсулы мальпигиевого тельца нефрона (объектив: 100; окуляр: 10).

На основе данных, полученных в результате проведённых измерений, вычисляются объёмные доли компонентов первичной почки (эпителия, полостей в эпителии, сосудов, мезенхимы); площади сечений канальцев (Sc), просветов канальцев (Snp), эпителия канальцев ^э) мезонефрона; объёмы клеток (Укл) и ядер (Уя) эпителия проксимального и дистального канальцев, висцерального и париетального листков капсулы мезонефрона.

Площади канальцев и просветов канальцев вычисляются по формуле круга S=nA2/4, где А - величина малого диаметра канальца в мкм. Площадь эпителия стенки канальцев определите как разницу площади канальца и площади его просвета.

Объёмы клеток и их ядер, учитывая то, что форма ядер эллипсоидной, вычисляются по формуле V=n/6’L’B2, где L - большой диаметр; В - короткий диаметр ядра. Определите коэффициент элонгации ядра клетки: E=L/B.

Ядерно-цитоплазматические отношения для клеток канальцев и листков капсулы нефрона определяются как отношение объёма ядра клетки к объёму

цитоплазмы.

Индекс митоза (1м) вычисляется как отношение числа митозов к общему количеству клеток и выражается в промиллях (‰). Индекс апоптоза (1А) вычисляли как отношение числа клеток с признаками апоптоза к общему количеству клеток и выражается в промиллях (^). Индекс секреторной активности (ICEKP) эпителиоцитов определяется как отношение числа клеток с признаками апокриновой секреции к общему количеству клеток и выражается в промиллях (‰).

результаты измерений занесите в таблицу Excel.

Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку результатов можно провести с использованием программы Excel и пакета «Statistica for Windows ver. 6.0». Для каждого параметра определяется средние значения и ошибка среднего. Для оценки достаточности объектов исследования и количества измерений используется показатель точности опыта (р), определяемый по формуле P=(т:M)x100%, где M - среднее арифметическое площади, m - ошибка среднего. После проверки распределения на нормальность, достоверность различий средних величин определяется по t-критерию Стьюдента или по U-критерию Манна-Уитни. Для выявления различий между значениями индексов (IМ, IА, ICEKP) можно применить критерий согласия $\%^2$. Оценку зависимости параметров проводят с использованием дисперсионного анализа ANOVA.

Более подробную информацию о статистической обработке данных можно получить в учебниках по медицинской статистике.

Список основной и дополнительной литературы

Основная литература:

1. Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.Н., Артемьев В.Н. Гистологическая техника: учебное пособие - Омск - Орёл: Омская областная типография, 2006. - 290 с.

Дополнительная литература:

1. http://www.studmedlib.ru/ru/book/ISBN9785970421307.htm

2. Гистология, эмбриология, цитология: учебник для вузов / Под ред. Э.Г.Улумбекова, Ю.А.Челышева - 3-е изд., - М.: ГЭОТАР-Медиа 2012. – 480с.

3. Артишевский А.А., Леонтюк А.С., Слука Б.А. Гистология с техникой гистологических исследований: учеб. пособие. - Мн.: Выш. шк., 1999. - 236 с.:

4. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов (под ред. О.В. Волковой, В.А. Шахламова, А.А. Миронова),- М., Медицина, 1987.