

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет»

Т.И. Вахрушева

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рекомендовано учебно-методическим советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный аграрный университет» для внутривузовского использования в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по специальности 36.05.01 «Ветеринария»

Электронное издание

Красноярск 2019

ББК 48.72

В 22

Рецензенты:

А.А. Люто, канд. ветеринар. наук, науч. сотр. ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

А.Б. Недочуков, директор ветеринарной клиники «Центровет», ветеринарный врач

Вахрушева, Т.И.
В 22 **Патоморфологические методы исследования:** учеб. пособие [Электронный ресурс] / Т.И. Вахрушева; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2019. – 266 с.

Учебное пособие представляет собой руководство по курсу дисциплины «Патоморфологические методы исследования», включает информацию о целях, задачах и методах патологической морфологии, а также технике проведения различных видов патоморфологических исследований. Издание подготовлено в соответствии с учебной программой дисциплины.

Предназначено для студентов очной и заочной форм обучения специальности 36.05.01 «Ветеринария», специализация «Лабораторное дело».

ББК 48.72

© Вахрушева Т.И., 2019

© ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|-----|
| ПРЕДИСЛОВИЕ | 5 |
| ТЕМА 1. ВВЕДЕНИЕ. ПОНЯТИЕ О МОРФОЛОГИИ И ПАТОМОРФОЛОГИИ | 6 |
| 1.1. Понятие, задачи и структура патологической морфологии | 6 |
| 1.2. Предмет, методы, виды и материалы морфологического исследования..... | 10 |
| ТЕМА 2. ПАТОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ВСКРЫТИЕ ТРУПОВ ЖИВОТНЫХ | 16 |
| 2.1. Цели и задачи и организация патолого-анатомического вскрытия трупов животных..... | 16 |
| 2.1.1. <i>Требования к месту патолого-анатомического вскрытия трупов животных.....</i> | 17 |
| 2.1.2. <i>Требования к спецодежде и инструментам для патолого-анатомического вскрытия трупов животных.....</i> | 20 |
| 2.1.3. <i>Техника общественной и личной безопасности при работе с трупным материалом.....</i> | 25 |
| 2.2. Методы, порядок и техника патолого-анатомического вскрытия трупов животных..... | 27 |
| 2.2.1. <i>Методы патолого-анатомического вскрытия трупов животных</i> | 27 |
| 2.2.2. <i>Порядок патолого-анатомического исследования трупа животного</i> | 30 |
| 2.3. Документация патолого-анатомического вскрытия: структура протокола патолого-анатомического вскрытия, правила оформления | 32 |
| ТЕМА 3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ И РЕСТАВРАЦИЯ ВЛАЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ | 50 |
| 3.1. Техника изготовления влажных музейных препаратов..... | 50 |
| 3.2. Техника реставрации влажных музейных препаратов | 69 |
| ТЕМА 4. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 74 |
| 4.1. История развития гистологических методов исследования..... | 74 |
| 4.2. Гистологические методы исследования клеток и тканей | 80 |
| 4.2.1. <i>Методы микроскопического исследования.....</i> | 80 |
| 4.2.2. <i>Гистологическое исследование фиксированных объектов. Изготовление гистологических препаратов</i> | 99 |
| 4.2.3. <i>Гистологическая техника.....</i> | 122 |
| 4.2.4. <i>Приготовление пленчатых препаратов.....</i> | 191 |
| 4.2.5. <i>Метод изготовления временных препаратов.....</i> | 192 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.6. Цитологические окраски..... | 192 |
| ТЕМА 5. ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ. МЕТОД ИММУНО- ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ. МЕТОД АВТОРАДИОГРАФИИ | 197 |
| 5.1. Гистохимические методы..... | 197 |
| 5.2. Метод иммунофлюоресценции и иммуногистохимии | 206 |
| 5.3. Метод авторадииографии | 209 |
| 5.4. Методы анализа изображения клеточных и тканевых структур ... | 210 |
| ТЕМА 6. БИОПСИЯ: ВИДЫ, ПРАВИЛА ЗАБОРА БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 212 |
| ТЕМА 7. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ | 218 |
| 7.1. Методы прижизненного наблюдения клеток и тканей | 218 |
| 7.2. Методы микроскопии, применяемые для витального исследования..... | 221 |
| 7.3. Гистологическая техника: прижизненная фиксация материала | 222 |
| ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ | 228 |
| ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ | 256 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 260 |
| ЛИТЕРАТУРА | 261 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ | 263 |

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие составлено в соответствии с утвержденной рабочей программой дисциплины «Патоморфологические методы исследования», изучение которой направлено на формирование у студентов следующих профессиональных компетенций: «осуществление необходимых диагностических, терапевтических, хирургических и акушерско-гинекологических мероприятий, знание методов асептики и антисептики и их применение, осуществление профилактики, диагностики и лечения животных при инфекционных и инвазионных болезнях при отравлении и радиационных поражениях, владение методами ветеринарной санитарии и оздоровлением хозяйств».

Учебное пособие является адаптированным для работы студентов специальности 36.05.01 «Ветеринария» очной и заочной форм обучения. Материалы пособия охватывают всю теоретическую часть дисциплины и включают разделы «Введение в предмет. Понятие о морфологии и патоморфологии»; «Патолого-анатомическое вскрытие трупов животных»; «Изготовление и реставрация влажных препаратов»; «Гистологические методы исследования»; «Гистохимические методы. Метод иммунофлюоресценции. Метод автордиографии»; «Биопсия: виды, правила забора биопсийного материала для морфологического исследования»; «Патоморфологические методы исследования живых объектов». Все разделы пособия для улучшения усвоения материала содержат контрольные вопросы. Для самопроверки в конце пособия приведены тестовые вопросы по всем разделам и варианты правильных ответов. Руководствуясь данным учебным пособием, студенты могут подготовиться к текущему и промежуточному контролю, провести самоконтроль, восполнить пробелы теоретических знаний с помощью правильных ответов и пояснений к ним. Учебное пособие снабжено цветными иллюстрациями, в том числе фотографиями, сделанными автором.

ТЕМА 1. ВВЕДЕНИЕ.

ПОНЯТИЕ О МОРФОЛОГИИ И ПАТОМОРФОЛОГИИ

1.1. Понятие, задачи и структура патологической морфологии

Морфология (*morphologia* – от греч. *morpho* + *logos* – форма и учение) – комплекс наук, изучающих форму и строение организмов в их онто- и филогенезе. Включает следующие дисциплины:

- системную и топографическую анатомию;
- гистологию;
- цитологию;
- эмбриологию;
- патологическую морфологию (патологическую анатомию).

Патологическая морфология (*anatomia pathologica*; син.: *патоморфология*; *патологическая анатомия*) – медицинская наука, изучающая патологические процессы и болезни, а также изменения, возникающие в клетках и тканях организма, органах и системах органов с помощью *научных морфологических методов исследования*.

Патологическая анатомия изучает морфологические проявления патологических процессов на разных уровнях организации живого: системном – системы органов и тканей; органном, тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном. Патологическая анатомия является одной из основных медицинских дисциплин и обязательна для изучения в медицинских и ветеринарных вузах.

Поскольку основными методами патологической анатомии являются морфологические, данная дисциплина часто обозначается как *патологическая морфология*, но этот термин имеет более широкое значение, так как патоморфологические изменения в организме больного животного, его органах и тканях исследуют врачи различных клинических и параклинических специальностей, а не только патологоанатомы.

Термины «*патологическая анатомия*» и «*врач-патологоанатом*» в настоящее время применяются для обозначения медицинской дисциплины в основном в Российской Федерации и ряде стран бывшего СССР и стран социалистического лагеря. В Европе и США используются понятия «*патология*» (*pathology*) и «*патолог*» (*pathologist*), однако полными синонимами эти понятия не являются: патология использует более широкий круг методов для диагностики заболеваний.

В непрофессиональной среде патологоанатомом нередко называют судебно-медицинского или судебно-ветеринарного эксперта, что связано с использованием в патологической анатомии и судебной

ветеринарной медицине метода патолого-анатомического вскрытия трупов. Тем не менее «Патологическая анатомия» и «Судебно-ветеринарная экспертиза» являются различными дисциплинами.

Задачи патологической морфологии

Основными задачами патологической морфологии являются следующие:

1. Выявление этиологии патологических процессов (каузальный генез) и условий их развития.

Причиной развития патологических процессов считается патоген, без участия которого развитие заболевания невозможно.

Условиями развития патологических процессов называются факторы, способствующие реализации действия основного патогена, но сами патологический процесс не вызывающие (факторы, предрасполагающие к развитию болезни).

2. Изучение патогенеза патологических процессов – механизма развития патологических процессов. Последовательность развивающихся морфологических изменений при этом называется *морфогенезом*. Для обозначения механизма выздоровления (реконвалесценции) используют термин «*саногенез*», а механизма умирания (смерти) – *танатогенез*.

3. Характеристика морфологической картины болезни – макро- и микроморфологических признаков.

4. Изучение осложнений и исходов заболеваний.

5. Исследование патоморфоза заболеваний, т. е. стойкого и закономерного изменения картины болезни под влиянием условий жизни – *естественного патоморфоза*, или лечения – *индуцированный патоморфоз*.

6. Изучение ятрогений – патологических процессов, развившихся в результате проведения диагностических или лечебных процедур.

7. Разработка вопросов теории диагноза.

8. Прижизненная и посмертная диагностика патологических процессов при помощи морфологических методов (задача патолого-анатомической практики).

Структура патологической анатомии

Патологическая анатомия состоит из трех основных разделов:

1. Общая патологическая анатомия – учение о типовых патологических процессах: нарушениях метаболизма (дистрофии), крово- и лимфообращения, воспалениях, иммунопатологических процессах, регенерации, атрофии, гипертрофии, опухолевом росте, некрозе и т. п.).

2. Частная (специальная) патологическая анатомия – изучает морфологические проявления отдельных заболеваний (нозологических форм), например, туберкулеза, сибирской язвы, цирроза печени, гломерулонефрита, фасциолеза, актиномикоза, отодектоз и т. п.

До середины XX века *частной патологической анатомией* называли патологическую анатомию отдельных органов (костей, печени, почек и т. п.), а *специальной* – патологическую анатомию болезней (патологическая анатомия нозологических форм), в настоящее время они отождествлены.

Болезнь (лат. *morbis*) – это состояние организма, выраженное в нарушении его нормальной жизнедеятельности, продолжительности жизни и его способности поддерживать свой гомеостаз. Является следствием ограниченных энергетических и функциональных возможностей живой системы в противопоставлении патогенным факторам.

Нозологическая форма (нозологическая единица; болезнь) – патологический процесс, характеризующийся общностью этиологии, патогенеза, клинических, типичных внешних проявлений (морфологических) и характерного поражения органов и тканей, а также подходов к его лечению.

Нозологические формы представлены несколькими *синдромами*, которые в свою очередь являются совокупностью *симптомов (отдельных признаков патологического процесса)*.

Синдром – в отличие от нозологической единицы, характеризуется общностью патогенеза и клинических и морфологических проявлений, но не этиологии.

Классификация болезней

Классификация болезней позволяет группировать болезни по различным принципам:

- *по причине* – инфекционные и неинфекционные;
- *по «точке приложения»* – заболевания органов дыхания, органов кровообращения и т. п.;
- *по характеру основного процесса* – воспалительные, дистрофические, опухолевые и пр.

3. Патолого-анатомическая практика – учение об организации патолого-анатомической службы и практической деятельности врача-патологоанатома. Практическая деятельность в области патологической анатомии называется *прозекторской работой*. Она осуществляется на кафедрах патологической анатомии медицинских и ветеринарных вузов, в патолого-анатомических отделениях клиник, ветери-

нарных станций, патолого-анатомических центрах. Врач-патологоанатом осуществляет прижизненную и посмертную морфологическую диагностику патологических процессов.

Прижизненную морфологическую диагностику проводят на операционном и биопсийном материале удаленных органов или их частей.

Биопсия (от греч. βίος – жизнь; ὄψις – зрение, взгляд, вид; буквальный перевод термина – «смотрю живое») – взятие ткани у больного животного или человека с диагностической целью. Получаемый при этом материал (обычно кусочек ткани) называется *биоптатом*.

Наиболее важное значение прижизненная патолого-анатомическая диагностика имеет в онкологии, в диагностике дегенеративных заболеваний, определение характера воспалительного процесса.

Посмертную морфологическую диагностику патологических процессов проводят посредством осуществления патолого-анатомического вскрытия трупов животных (аутопсии).

Аутопсия (от греч. αὐτός – сам; ὄψις – зрение, взгляд, вид; буквальный перевод термина – «смотрю сам») – исследование трупов животных.

Результаты морфологического исследования оформляются в виде протокола патолого-анатомического вскрытия трупа с составлением *патолого-анатомического диагноза и заключения*.

подавляющую часть работы современного прозектора (клинического патолога) представляет прижизненная микроскопическая диагностика по результатам исследования биологических материалов, удаленным у больных животных хирургами, эндоскопистами, онкологами, хирургами и прочими оперирующими специалистами.

Указанный материал включает три главных типа:

1) *биоптаты* – изъятые у пациента для установления патогистологического диагноза;

2) *операционный материал* – удаленный с лечебной целью и требующий тоже установления, подтверждения или уточнения патогистологического диагноза;

3) *цитологический материал* – мазки, смывы, аспираты, центрифугаты и другие, изъятый также для установления микроскопического диагноза.

Патологоанатомы практически всегда принимают в комиссиях по исследованию летальных исходов и лечебно-контрольных комиссиях.

1.2. Предмет, методы, виды и материалы морфологического исследования

Предметом патолого-анатомической практики являются следующие процессы:

- 1) организация патолого-анатомического вскрытия трупов животных в ветеринарии;
- 2) техника проведения аутопсии;
- 3) оформление документации патолого-анатомического вскрытия;
- 4) техника и методы работы с операционным и биопсийным материалом;
- 5) оформление заключения по данным исследования операционного и биопсийного материала.

Понятие о методах морфологического исследования

Современные методы изучения особенностей патоморфологических изменений разнообразны и сложны. Поскольку изучение организма происходит на разных уровнях его организации – клеточном, тканевом, органном и системном, то все методы исследования можно подразделить на две большие группы: микроскопические методы и макроскопические методы.

Морфологические методы

Особенностью морфологических методов исследования в биологии и медицине является использование *эмпирической информации*, полученной непосредственно при изучении объекта. В отличие от этого, можно изучать свойства объекта, непосредственно не воспринимая его, а исходя из характера вторичных изменений в среде, вызванных самим существованием объекта – такие методы исследования широко используются в патологической физиологии и в клинической медицине. Другими словами, в основе *морфологического метода* лежит непосредственное восприятие изучаемого предмета, прежде всего его визуальная характеристика как результат наблюдения.

Морфологические методы, как и любые другие научные методы, реализуются в три этапа:

1. *Эмпирический этап* – получение первичной информации об объекте от органов чувств.

В патологической морфологии, помимо визуальной, большое значение имеет тактильная информация, например, пальпаторное исследование при определении консистенции измененной ткани.

2. *Теоретический этап* – этап осмысления полученных эмпирических данных и их систематизации.

Этот этап требует широкой эрудиции исследователя, поскольку эффективность восприятия эмпирической информации напрямую зависит от полноты теоретических знаний, что выражено в формуле «Мы видим то, что знаем».

3. *Этап практической реализации* – использование результатов исследования в практической деятельности.

Результаты морфологического исследования в медицине являются основой диагноза, что и определяет важное практическое значение метода.

Дескриптивный метод

Среди морфологических методов на эмпирическом этапе особое значение имеет *дескриптивный метод (метод описания)* – метод фиксации воспринимаемой информации с использованием вербальных символов (средств языка как знаковой системы). Корректное описание патологических изменений является своеобразной информационной копией объекта исследования, поэтому оно должно быть как можно более полным и точным.

Метод описания макрообъектов применяется не только патологоанатомами и судебно-медицинскими экспертами, но и врачами многих клинических специальностей. Наиболее часто метод описания макрообъектов используют при обнаружении врачом во время осмотра больного изменений покровных тканей (кожи и видимых слизистых оболочек). При хирургических вмешательствах внешние изменения внутренних органов, прежде всего удаляемых, хирург отражает в протоколе операции.

Классификация морфологических методов

К основным морфологическим методам относят следующие:

1. *Макроморфологический метод* – метод изучения биологических структур без значительного увеличения объекта. Исследование при помощи лупы с небольшим увеличением также относится к макроморфологическому методу.

Макроморфологический метод нецелесообразно называть «макроскопическим исследованием», так как получаемая информация является не только визуальной.

2. *Микроморфологический (микроскопический) метод* – метод морфологического исследования, который осуществляют с помощью

специальных приборов (микроскопа), значительно увеличивающих изображение объекта.

Наиболее широко используют такой метод микроскопического исследования, как *световая микроскопия* (свето-оптическое исследование), также активно развивается система *гистохимических* и *иммуногистохимических исследований* для определения патологических процессов на молекулярном и *генетическом уровне*.

Гистохимический метод исследования – метод выявления различных химических веществ и продуктов их метаболизма в тканях с помощью дифференциального окрашивания. Некоторые методы окрашивания позволяют выявлять в клетках те или иные химические вещества, возможно дифференциальное окрашивание жиров, гликогена, нуклеиновых кислот, нуклеопротеинов, определенных ферментов и других химических компонентов клетки.

Иммуногистохимический метод – метод микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое выявление в них искомым веществ, основан на обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу, которое в рамках исследования является антигеном.

Материалы исследования в патологической анатомии

Объекты исследования патологической анатомии можно разделить на три группы:

1) *трупный материал*;

2) *органы, ткани и их фрагменты, клетки и их части, продукты секреции, биологические жидкости*;

3) *экспериментальный материал*, получаемый клинико-морфологическим и экспериментальными методами, которые используют для воссоздания моделей болезней на любых стадиях, выяснения динамики, оценки диагностических, лечебных, профилактических мероприятий.

Макроморфологическое исследование

В патологической анатомии исследование и описание макрообъектов (трупа, органов или их фрагментов) является первым этапом морфологического анализа аутопсийного и операционного материала, дополняемого затем микроскопическим и при необходимости молекулярно-биологическим исследованием.

Основной целью метода является установление патолого-анатомического диагноза и причин смерти животного, а также эффективности проводимого лечения, выявление врачебных ошибок.

Макроморфологические параметры

Описание патологических изменений в органах проводят с использованием следующих основных параметров:

1) локализация патологического процесса в органе при поражении не всего органа, а его части;

2) величина органа, его фрагмента и его патологически измененного участка (размерный параметр, объемная характеристика);

3) конфигурация (очертания, форма) патологически измененного органа или его части;

4) цветовая характеристика ткани с поверхности и на разрезе;

5) консистенция патологически измененной ткани;

6) степень однородности патологически измененной ткани по цвету и консистенции. Если параметр не изменен, его обычно не отражают в описании объекта (для большей достоверности описательной части протокола исследования также описываются и не измененные основные органы ткани и системы);

7) забор материала для гистологического и прочих исследований как внешне патологически измененных органов и тканей, так и внешне нормальных органов и тканей, так как внешне нормальный вид органа и ткани не гарантирует нормального строения данной ткани на гистологическом уровне именно поэтому необходимо брать для исследования и внешне не измененные ткани.

В зависимости от оценки морфологических параметров макроморфологические методы исследования делят:

– на *субъективные* – оценка цвета, консистенции, рисунка, специфического запаха;

– *объективные* – оценка расположения, устанавливаются по капсуле и выбуханию на разрезе, массы, объема (в сосуде с водой), линейных размеров органа.

Микроморфологические методы

Специфическим для патолого-анатомической практики является исследование тканевых срезов.

Тканевые срезы для обычного свето-оптического исследования готовят при помощи специальных приборов (микротомов) после предварительной подготовки – проводки, либо замораживания и ок-

рашивают различными методами. Оптимальная толщина таких срезов 5–7 мкм (но может варьировать, в зависимости от метода и цели исследования от ультратонких 0,5–3 мкм до толстых в 20–40 мкм).

Гистологический препарат представляет собой окрашенный тканевый срез, заключенный между предметным и покровным стеклами в прозрачной заключающей среде (бальзам, полистирол и т. п.).

Различают следующие методы окраски срезов:

1) *обзорные* (общие);

2) *специальные* (дифференциальные) – используют для выявления определенных тканевых структур и компонентов, тех или иных веществ (гистохимическое и иммуногистохимическое исследование).

При использовании обзорного метода чаще используют окраску тканевых срезов гематоксилином и эозином.

Гематоксилин – природный краситель, экстракт коры тропического кампешевого дерева – окрашивает в синий цвет ядра клеток («ядерный краситель»), отложения солей кальция, колонии грампозитивных микроорганизмов и волокнистую ткань в состоянии мукоидного отека. Гематоксилин является основным (щелочным) красителем, поэтому свойство ткани воспринимать его называется базофилией (от лат. *basis* – основание).

Эозин – синтетическая розовая краска, краска цвета утренней зари (названа по имени древнегреческой богини зари Эос). Эозин относится к кислым красителям, поэтому свойство тканевых структур воспринимать его называется ацидофилией (лат. *acidum* – кислота), или *оксифилией* (греч. ὄξος – уксус, кислый напиток). Эозином окрашивают цитоплазму большинства клеток («цитоплазматический краситель»), волокнистые структуры и неизмененное межклеточное вещество.

Широко распространены гистохимические методы выявления в тканевых срезах волокнистых структур соединительной ткани, прежде всего коллагеновых волокон.

В России традиционно предпочтение отдают методу *Ван Гизона* (*Van Gieson*); при этом ядра клеток, грампозитивные микроорганизмы и депозиты кальция окрашивают железным гематоксилином Вейгерта в черный цвет, коллагеновые волокна и гиалин – в красный цвет кислым фуксином, остальные структуры межклеточного вещества и цитоплазма клеток – в желтый цвет пикриновой кислотой.

В странах Запада чаще используют так называемые трихромные (трехцветные) методы окраски волокнистой соединительной ткани с

использованием фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот (метод Мэллори, метод Массона и др.). При этом коллагеновые волокна окрашиваются в синий цвет, ретикулярные (ретикулиновые) – в голубой, эластические – в красный.

Цитологическое исследование – прижизненные микроморфологические исследования операционного и биопсийного материала. Заключается в цитологическом исследовании мазков и мазков-отпечатков тканей, секретов, экскретов, полостных жидкостей (транса и экссудата).

Материал берут во время операции с помощью лапаратомии, аспирационной пункционной биопсии после клинического обследования животного. Полученный материал фиксируют на стеклах, окрашивают специальными методами, а затем микроскопируют. Некоторые методики предусматривают микроскопию неокрашенного (нативного) материала.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию «патологическая морфология».
2. Какова роль патологической анатомии как науки? Место и связь ее с другими дисциплинами.
3. В чем состоит научное и практическое значение патологической морфологии (анатомии)?
4. Какова структура дисциплины «Патологическая анатомия»?
5. Что изучает общая патологическая анатомия?
6. Каков предмет и задачи частной патологической анатомии?
7. Какие основные материалы и методы исследования использует патологическая морфология (анатомия)?
8. Какова роль у посмертного вскрытия трупов животных как у основного метода исследования патологической анатомии?
9. Что такое биопсия?
10. Назовите уровни изучения структурных основ болезни, используемые патологической анатомией.

ТЕМА 2. ПАТОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ВСКРЫТИЕ ТРУПОВ ЖИВОТНЫХ

2.1. Цели, задачи и организация патолого-анатомического вскрытия трупов животных

В соответствии с Законом Российской Федерации «О ветеринарии» в России государственной ветеринарной службой осуществляется научно обоснованная комплексная система профилактических мероприятий, обеспечивающих развитие животноводства, предупреждающих возникновение и распространение болезней животных, многие из которых опасны и для человека. При возникновении болезней решающее значение приобретает своевременная и точная диагностика, на основе которой осуществляются лечебно-профилактические мероприятия по оздоровлению животных. Патолого-анатомическое вскрытие павших или вынужденно убитых животных – это один из обязательных методов диагностики инфекционных, инвазионных и незаразных болезней животных.

Патолого-анатомическое вскрытие (секция, абдукция, аутопсия) – метод исследования, применяемый для изучения патологических процессов, болезней и определения причины смерти животного.

Цель патолого-анатомического вскрытия – это своевременное выявление причины заболевания и гибели животного.

Секционная работа представляет собой одно из важнейших звеньев в работе ветеринарного врача. Она контролирует и исправляет ошибки, допущенные в клинической работе, обуславливает быстрый процесс в области изучения клиники, патоморфологии, патогенеза, лечения и профилактики болезней.

В ветеринарной практике трупы животных разрешено вскрывать только специалистам ветеринарной медицины, имеющим диплом ветеринарного врача или фельдшера. Ветеринарные врачи и фельдшеры организуют и проводят патолого-анатомическое вскрытие трупов животных и оформляют соответствующую документацию, содержащую заключение о причинах смерти животного. При этом ветеринарные специалисты строго соблюдают методические и технические правила патолого-анатомического исследования с учетом возрастных анатомо-физиологических особенностей животных разных видов, а также характера болезни; меры общественной и личной безопасности, порядок проведения санитарной утилизации трупов. В необходимых случаях проводят комплексные лабораторные исследования.

В некоторых случаях патолого-анатомическое вскрытие проводят в присутствии работников хозяйства (владельцев животных), представителей муниципальных или федеральных исполнительных органов, а судебно-ветеринарное вскрытие – в присутствии представителей следственных органов и понятых.

Патолого-анатомическое вскрытие трупов животных может проводиться с различными целями:

- с учебной – для изучения сущности морфологических проявлений болезненных процессов при различных заболеваниях;

- диагностической – для выяснения причин смерти животного или уточнения правильности прижизненного клинического диагноза и целесообразности проведенного лечения;

- целью судебной ветеринарной экспертизы – для получения объективных доказательств в следственном и судебном процессах. Этот вид вскрытия производят по предписанию органов следствия, суда или прокуратуры, когда в случае гибели животного возникает подозрение на преступное деяние, неправильную эксплуатацию, халатность ухаживающего персонала, врачебные ошибки и др.;

- целью научного исследования – для получения новых данных о морфологических изменениях органов, тканей и систем при различных патологических процессах, а также для расширения знаний об этиологии, патогенезе и сущности болезней человека и животных.

2.1.1. Требования к месту патолого-анатомического вскрытия трупов животных

Патолого-анатомическое вскрытие трупов животных проводят с соблюдением и применением всех правил секционной техники. Оно требует специальных помещений, оборудованных соответствующим образом (секционных залов или прозекториев). Такие имеются при высших и средних специальных учебных заведениях, где готовят врачей ветеринарной медицины или ветеринарных фельдшеров, а также на мясокомбинатах; утилизационных заводах; бойнях; в крупных ветеринарных лечебницах; лабораториях; заводах по производству мясокостной муки.

Проводить патолого-анатомическое вскрытие трупов животных в животноводческих помещениях, на пастбищах и других местах скопления животных строго запрещено во избежание возможного разноса возбудителей инфекционных болезней.

При проектировании секционного зала, необходимо иметь в виду, что у данного помещения должен быть отдельный вход с возможностью подъезда транспортных средств для доставки и эвакуации трупного материала.

Секционный зал устраивают по правилам, принятым для хирургических операционных. Эти помещения должны отвечать следующим требованиям:

- вся территория прозектория должна быть разграничена на отдельные помещения: комната для прозектора и обслуживающего персонала; комната для хранения патолого-анатомического материала, оборудованная холодильными шкапами; техническая комната; душевая;

- хорошее освещение – секционные помещения должны быть просторными и светлыми, иметь большую площадь окон: соотношение площади окон к площади пола должно составлять 1:4–1:5. При использовании искусственного освещения лучше пользоваться лампами дневного света, они меньше всего искажают цветовые оттенки органов и патологических процессов. Можно использовать электрические лампы высокой мощности (более 300 Вт);

- секционные помещения должны быть легко вентилируемыми, желательно с принудительной тягой. Вытяжная вентиляция должна быть рассчитана на полную замену воздуха в помещении за один час (рис. 1);

- секционные помещения должны иметь канализацию и водопровод с горячей и холодной водой, поступающей как к секционным столам, так и к раковинам для мытья рук, инструментов, инвентаря;

- при устройстве канализации обязательно делают специальный отстойник, так как в общую канализационную систему вода поступает только после обезвреживания ее в отстойнике, где все сточные воды прозектория дезинфицируют;

- по возможности, секционное помещение оборудуют отдельной душевой;

- стены и пол прозектория должны легко мыться и дезинфицироваться. Пол в прозектории должен иметь необходимый уклон для стока воды (рис. 1);

- секционное помещение должно быть оборудовано прочными и устойчивыми столами для вскрытия трупов животных, шкапами для хранения спецодежды, инструментов, посуды, реактивов и патолого-анатомического материала, столами для инструментов и ведения

записей, умывальником с дезинфицирующими растворами, электроплитой, автоклавом, также необходимо иметь передвижную конторку или столик для записи протоколов под диктовку вскрывающего; передвижной металлический столик со стеклянной доской для бактериологических исследований;

- в прозектории необходимо иметь не менее двух секционных столов: один для вскрытия трупов крупных животных; а другой для вскрытия трупов мелких животных и исследования органов. Для вскрытия кишечника крупных животных пользуются специальным подвижным столом (легкой конструкции). Основание его делается из полого железа, а столешница – из толстого листа цинка, дюралюминия или пластика. В столешнице должно быть отверстие для стока жидкостей. Длина стола – 8 м, ширина – 1 м, высота – 80–90 см.

Столешница по краям должна иметь возвышения (бортики) и уклон к центру (сточному отверстию). Секционный стол для крупных животных делается прочным, лучше всего с железной или каменной, мраморной столешницей. Для укрепления трупа в спинном положении применяют специальные металлические подставки.

Для транспортировки трупов в прозектории оборудуют подвесные подпотолочные рельсы и блоки или специальную лебедку;

- в секционном зале должно быть тепло, температура не должна опускаться ниже 20 °С.



Рисунок 1 – Секционный зал (прозекторий)

В случае отсутствия специальных помещений для секции, вскрытие производят на скотомогильниках, вблизи огороженных утильустановок или биотермических ям, а также на специальных бетонированных или асфальтированных площадках или в полевой обстановке. Выбор места для секции и его устройство определяет специальная комиссия, состоящая из представителей федеральных исполнительных органов и ветеринарно-санитарного надзора.

В любом случае необходимо создание условий для безопасной работы: в ведрах заготавливают достаточное количество холодной и горячей воды, подготавливают дезинфицирующие средства для дезинфекции рук и места вскрытия. На месте вскрытия сооружают примитивный стол для вскрытия трупа и исследования органов. В летнее время при обилии мух и кровососущих насекомых заготавливают репелленты и москитные сетки. Если на трупе есть насекомые, их уничтожают 10–20 %-м раствором формалина.

При вскрытии трупов вынуждено убитых животных с диагностической целью (при подозрении на предмет заболевания туберкулезом, бруцеллезом и т. д.), а также вскрытии выбракованных по хозяйственным и ветеринарно-санитарным причинам, секцию осуществляют по правилам ветеринарно-санитарной экспертизы на санитарных бойнях или на убойных пунктах животноводческих хозяйств.

2.1.2. Требования к спецодежде и инструментам для патолого-анатомического вскрытия трупов животных

В целях предохранения себя и окружающих от заражения секция трупов животных проводится исключительно в спецодежде поверх основной одежды ветеринарного специалиста, так как брызги крови, накопившейся в полостях жидкости, различные выделения из естественных отверстий могут послужить источником заражений как самого вскрывающего, так и окружающих. Поэтому вскрытие проводят в специальной защитной одежде и обуви, которые для других целей использовать категорически запрещено. Основные принципы при выборе спецодежды – это прочность, легкость, удобство, гигиеничность, свобода движений.

Вскрывающий и его помощник надевают полотняный халат. Длина халата должна достигать границы между нижней и средней третью голени. Поверх халата надевают водонепроницаемый легкий фартук (из резины или синтетической клеенки), который должен быть

на 3–5 см длиннее халата и закрывать голенище обуви. Завязывают его только сзади. Чтобы рукава и одежда не намокли, надевают нарукавники, изготовленные из таких же тканей, что и фартук. При вскрытии трупов животных, павших от заразных болезней, поверх полотняного халата надевают клеенчатый халат, а на предплечье обязательно – клеенчатые нарукавники (рис. 2, 3).

Вскрытие трупов производят только в резиновых перчатках. Поверх обшлагов халата надевают нарукавники, голову покрывают белой полотняной шапочкой или косынкой, для большего удобства можно работать в защитных пластиковых или стеклянных очках. Ноги защищают сапогами (резиновыми) или бахилами.



Рисунок 2 – Спецдежда прозектора



Рисунок 3 – Спецдежда прозектора (работа студентов в прозектории)

Требования к инструментам для патолого-анатомического вскрытия трупов животных

Для вскрытия трупов животных промышленность выпускает патолого-анатомический набор инструментов (рис. 4). Иногда набор инструментов ветеринарный специалист подбирает самостоятельно.

Для производства детального вскрытия трупов животных прозектору необходимы следующие инструменты:

Секционные ножи: 1) секционный нож большой; 2) ампутационный нож; 3) мозговой нож с тонким лезвием для разрезания мозга; 4) вирховские скальпели; 5) обычные хирургические скальпели; 6) бритва для вырезания тонких пластинок из органов.



Рисунок 4 – Секционный инструментарий: 1 – мозговой нож; 2 – аутопсийный молоток; 3 – анатомические ножницы; 4 – троакар; 5 – анатомический пинцет; 6 – долото; 7 – большой секционный ланцет; 8 – кишечные ножницы; 9 – ампутационный нож; 10 – три малых скальпеля; 11 – остроконечный крючок; 12 – реберные ножницы; 13 – пила

Ножами производят большую часть разрезов. Большие секционные ножи предназначены для расчленения трупов крупных животных, отделения конечностей, разрезов мускулатуры, рассечения паренхиматозных органов, они также удобны для отделения кожи (рис. 5). Малые ножи типа брюшистых скальпелей используют для препарирования (рис. 6).

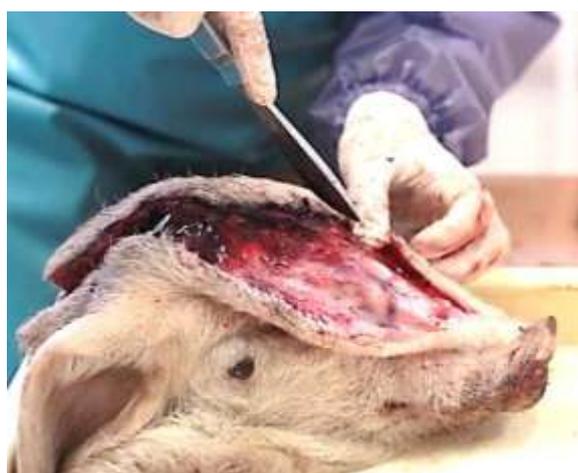


Рисунок 5 – Использование ампутационного ножа для отделения кожных покровов



Рисунок 6 – Использование скальпеля разреза стенки сердца

Ножницы: 1) обычные прямые медицинские; 2) ножницы пуговчатые с пуговкой на одной бранше для вскрытия бронхов и сосудов; 3) ножницы кишечные для вскрытия кишечника крупных животных; 4) реберные ножницы для разрезания ребер мелких животных; 5) ножницы, изогнутые под углом для вскрытия сосудов и каналов. Несколько видов ножниц используют для вскрытия сосудов, бронхов, протоков желез, а также для разрезания ребер и костей (рис. 7, 8, 9). Всякий разрез ножом или ножницами нужно производить под контролем глаз, чтобы не упустить то, что после разреза окажется утраченным. Свищевые отверстия, раны и прочее лучше обходить, а органы извлекать вместе с ними и исследовать уже на препаровочном столике.



Рисунок 7 – Использование анатомических кишечных ножниц при вскрытии тонкого кишечника



Рисунок 8 – Использование прямых ножниц для вскрытия желудка свиньи

Пинцеты: 1) шоровские пинцеты с ложечками на концах, очень удобны для удержания органов при разрезах и осмотрах; 2) анатомический длинный пинцет. Пинцеты должны быть с закругленными, пуговчатыми или с зубцами браншами на концах. Хирургические при вскрытии практически не используют, так как они нарушают целостность тканей, а не фиксируют их (рис. 9). Анатомические пинцеты используют для взятия мелких кусочков органов и тканей.

Щипцы, костодержатели, молоток, долото, топорик, рахиотом – используют для фиксации и расчленения костной ткани и для вскрытия позвоночного канала.

Пилы: 1) анатомическая листовая; 2) анатомическая лучковая; в крупных залах иногда устанавливают электропилу для распила трубчатых костей и позвоночника крупных животных. Пилы необходимы для распилки костей (рис. 10).



Рисунок 9 – Использование пинцета при извлечении трахеи



Рисунок 10 – Использование листовой анатомической пилы при вскрытии полости черепа

Тиски – для фиксирования костей.

Зонды: пуговчатый и желобоватый.

Крючки с ручками.

Измерительные металлические линейки, рулетки – предназначены для измерения размеров органов и т. д. (рис. 11).

Весы, измерительные цилиндры и мензурки – необходимы для взвешивания органов и измерения объема жидкостей.

Луна.

Точильный брусок и оселок.

Губки.



Рисунок 11 – Измерение размеров селезенки кошки с помощью линейки

Кроме инструментов, необходимы кюветы, тазы, ведра с крышками, емкости с дезинфицирующими растворами, емкости для отбора

патолого-анатомического материала, фиксаторы для патолого-анатомического материала и т. д. Режущие инструменты должны быть острыми, содержаться сухими и чистыми в специальных шкафах. При проведении вскрытия инструменты находятся на специально предназначенном для них столике.

2.1.3. Техника общественной и личной безопасности при работе с трупным материалом

Прежде чем начать патолого-анатомическое исследование трупа животного, ветеринарный специалист как лицо ответственное за строгое и безупречное выполнение ветеринарных правил обеспечивает охрану здоровья человека, окружающей среды, создает условия для проведения этой работы, принимая все общие и специальные меры предосторожности, предупреждающие распространение инфекции, загрязнение животноводческих помещений и окружающей среды (пастбищ, водоемов), обеспечивая личную безопасность как самого вскрывающего, так и его помощников, других лиц, имеющих отношение к вскрытию.

Прозектор, изучая анамнестические, эпизоотологические, клинические данные, условия содержания, кормления, эксплуатации животных, а также время и обстоятельства гибели – намечают план необходимых мероприятий по организации и проведению патолого-анатомического вскрытия. Предварительно лабораторным исследованием исключают зооантропонозные болезни (сибирскую язву, сап и др.), при которых проведение патолого-анатомического вскрытия запрещено, при установлении данных инфекционных заболеваний трупы уничтожают на утильзаводах или сжигают вместе с кожей.

Вскрывают трупы в специально отведенном для этого месте. К месту вскрытия их перевозят на специально оборудованных машинах, кузов которых обивают оцинкованным железом и после использования обрабатывают дезинфицирующими веществами. Перед транспортировкой в естественные отверстия трупов животных, особенно павших от инфекционных болезней вставляют ватные тампоны, смоченные дезинфицирующим раствором. Место, где находился труп, очищают, снимают слой земли, обрабатывают дезинфицирующим раствором, затем закапывают, подстилку сжигают.

Для проведения патолого-анатомического вскрытия необходимо:

- оборудовать место для вскрытия трупов;
- обеспечить сотрудников спецодеждой и инструментарием;

- иметь достаточное количество дезинфицирующих средств, теплой и холодной воды;
- организовать утилизацию биоотходов;
- знать и уметь выполнять технику вскрытия трупов разных видов животных и птиц; правила отбора, консервирования и отправки патолого-анатомического материала для лабораторных исследований; правила личной гигиены и охраны окружающей среды; правила оформления документации патолого-анатомического вскрытия и сопроводительных к патолого-анатомическому материалу.

При вскрытии трупов животных категорически запрещено:

- разбрасывать органы и части трупов;
- разбрызгивать кровь и другие жидкости;
- допускать к трупу посторонних лиц и животных.

При случайном ранении прозектора вскрытие необходимо приостановить, промыть рану кипяченой водой, выжать побольше крови, края раны смазать настойкой йода, а место повреждения – раствором бриллиантовой зелени. После остановки кровотечения в случае необходимости наложить временную легкую марлевую повязку. Во избежание промокания ее прикрывают клеенкой или резиновым напальчником, после этого заканчивают вскрытие. По окончании вскрытия и очищения рук рану дезинфицируют вторично и накладывают на нее хирургическую повязку.

После окончания вскрытия трупный материал убирают, проводят заключительную обработку и дезинфекцию спецодежды, обуви, инструментария, стола и секционного помещения. Уборку трупов при вскрытии в поле (на скотомогильниках) производят под личным наблюдением прозектора или одного из лиц ветеринарного персонала.

Инструменты предварительно протирают от загрязнений при помощи щетки и мыла, а затем, обернув марлей, дезинфицируют в кипящей воде с содой. Инструменты можно стерилизовать и холодным способом. Для этого их помещают в «тройной» раствор Каретникова (карболовая кислота 3,0; карбонат натрия 15,0; формалин 20,0 и дистиллированная вода 1000,0) на 30–60 минут; помещают в раствор диоксида 1:3000 на 30 минут; помещают в 2 %-й раствор хлорамина; в 5 %-й раствор лизола; или в 3 %-й раствор формалина. После обработки инструменты насухо вытирают и убирают в шкаф. Для предохранения инструментов от ржавчины их рекомендуется смазывать каким-нибудь жиром. Губки и щетки ополаскивают в воде и хранят в растворе лизола до следующего вскрытия.

Руки после снятия перчаток моют теплой проточной водой с мылом. Для дезинфекции рук можно использовать растворы диоксида, дегмина, дегмицина и др.

Секционный зал, стол и его принадлежности, а также пол – по окончании вскрытия и уборки трупа, тщательно моют и дезинфицируют хлорной или негашеной известью; 5 %-м раствором лизола; 5 %-м раствором креолина; 2 %-м раствором карболовой кислоты в течение 30–60 минут.

Спецодежду (фартуки, нарукавники, сапоги) – моют с мылом и дезинфицирующими растворами: 2%-м раствором хлорамина; 5%-м раствором лизола; 3%-м раствором формалина. Халаты и головные уборы кипятят или обеззараживают в автоклаве.

Все дезинфицирующие средства хранят в специальном закрытом на замок помещении.

2.2. Методы, порядок и техника патолого-анатомического вскрытия трупов животных

2.2.1. Методы патолого-анатомического вскрытия трупов животных

Патолого-анатомическое вскрытие (секция, абдукция, аутопсия, вивисекция) – метод исследования, применяемый для изучения патологических процессов, болезней и определения причины смерти животного.

Существует три основных метода вскрытия трупов животных:

- 1) метод изолированного извлечения отдельных органов;
- 2) метод извлечения полного органокомплекса (полная эвисцерация);
- 3) метод частичного расчленения органокомплекса.

Метод изолированного извлечения отдельных органов (разработан Р. Вирховым), при котором после предварительного осмотра органы извлекают с учетом анатомо-физиологических связей и патологических изменений и исследуют каждый в отдельности по мере доступа к ним (рис. 12).

Достоинства этого метода состоят в том, что он прост в исполнении и легко доступен, но его существенным недостатком является нарушение анатомо-физиологических связей между органами, что может исказить целостность патолого-анатомической картины и связь изменений между отдельными органами. В настоящее время этот метод практически не применяют.

Метод извлечения полного органокомплекса (полная эвисцерация), разработан Г.В. Шором – заключается в полном комплексном извлечении органов головы, шеи, грудной, брюшной и тазовой полостей, с последующим их исследованием без отделения друг от друга (рис. 13).

Этот метод позаимствован ветеринарными специалистами из медицины. Впервые он был разработан и использован в первой половине XX века профессором Георгием Владимировичем Шором для вскрытия трупов людей. Метод издавна применяется в ветеринарной практике как метод Шора.

Достоинства метода состоят в том, что он позволяет исследовать органы, не нарушая анатомо-физиологических связей между ними, что особенно важно при заболеваниях лимфатической и кровеносной системы, опухолевых процессах, некоторых инфекционных заболеваниях (туберкулез) и т. д. Недостаток этого метода – техническая сложность.

В ветеринарной практике этот метод применяют при вскрытии трупов мелких животных и преимущественно с малой длиной кишечника (молодняк, собаки, пушные звери, кошки и др.).

Метод частичного расчленения органокомплекса заключается в расчленении единого органокомплекса на несколько сегментов при сохранении естественных анатомо-физиологических и системных связей в изъятых частях (рис. 14).

Достоинства метода состоят в том, что он дает возможность исследовать комплексы органов: язык, органы шеи и грудной полости; печень, двенадцатиперстную кишку и поджелудочную железу; тонкий и толстый кишечник; мочеполовые органы и т. д. Недостаток состоит в том, что частично нарушаются анатомо-физиологические связи между органами.

При вскрытии методом частичного расчленения органокомплекса следует как можно меньше нарушать естественную связь органов.

Указанные методы исследования применяют с учетом анатомо-физиологических особенностей животных разных видов, возраста, характера болезни и задач патолого-анатомического исследования, но во всех случаях стремятся более полно и обстоятельно исследовать каждый орган.

Неполное (частичное) вскрытие – чаще практикуют в тех случаях, когда исследователь по разным причинам не может получить труп целиком.



Рисунок 12 – Извлечение печени свиньи методом изолированного извлечения отдельных органов

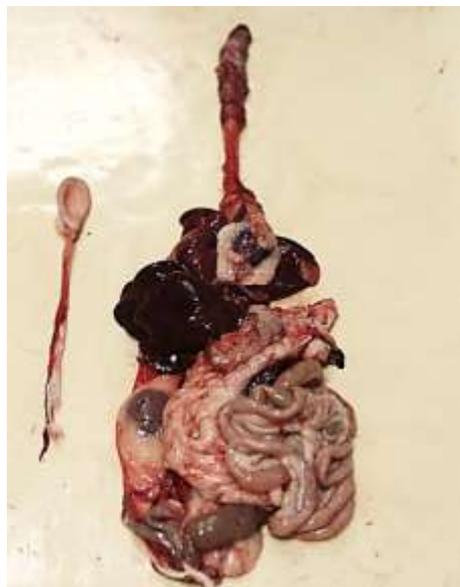


Рисунок 13 – Извлечение органов трупа кошки методом полной эвисцерации



Рисунок 14 – Извлечение тонкого и толстого кишечника трупа свиньи методом частичного расчленения органокомплекса



Рисунок 15 – Патолого-анатомическое исследование фрагментов конечностей дикого животного (лося)

2.2.2. Порядок патолого-анатомического исследования трупа животного

Перед патолого-анатомическим вскрытием трупа рекомендуется собрать анамнез. Сбор анамнестических данных включает следующую информацию: условия содержания, кормления и эксплуатации, историю болезни и обстоятельства смерти животного. При возможности необходимо расспросить обслуживающий персонал о признаках болезни, обстоятельствах смерти, помощи, которая была оказана животному, имеются ли в хозяйстве животные с признаками болезни, подобными изменениями, наблюдающимися у погибшего.

При подозрении на заразное заболевание, если погибло несколько животных, сначала осматривают клинически здоровых животных, затем подозреваемых в заболевании, а потом имеющих больных. Желательно осмотреть места содержания, пастбы и гибели животных.

При проведении патолого-анатомического исследования трупа животного необходимо соблюдать определенный порядок и последовательность в работе.

1. *Наружный осмотр* трупа включает исследование внешнего вида трупа до вскрытия естественных полостей: положение трупа, посмертные изменения, а также поверхностно расположенные органы и ткани.

Наружный осмотр проводят по следующей схеме:

- устанавливают опознавательные признаки трупа животного – определяют вид, породу, возраст, окрас, (масть), особые приметы животного;
- общий вид трупа: телосложение, упитанность, форма живота, форма и симметричность сторон грудной клетки, вес и промеры трупа, положение трупа;
- кожа и ее производные (шерсть, рога, копыта, когти);
- состояние естественных отверстий (глаза, рот, нос, уши, анус, наружные половые органы) и видимых слизистых оболочек;
- подкожная клетчатка (после снятия кожи);
- молочная железа и наружные половые органы;
- поверхностные (соматические) лимфатические узлы (подчелюстные, заглоточные, поверхностные шейные, надколенные, наружные паховые и др.);
- скелетная мускулатура;
- кости и костный мозг, сухожилия, связки и суставы;
- посмертные (трупные) изменения.

2. *Внутренний осмотр трупа* заключается во вскрытии естественных полостей (грудной, брюшной, полости черепной коробки), их осмотре и извлечении органов. Перед вскрытием трупа, с него снимают кожу.

В первую очередь вскрывают и описывают паренхиматозные органы. Желудочно-кишечный тракт вскрывают в последнюю очередь, для того чтобы содержимое кишечника не загрязнило остальные органы.

Порядок вскрытия полостей и извлечение органов зависят от вида исследуемого животного. При использовании метода частичного расчленения органокомплекса последовательность извлечения и исследования органов должна быть следующей:

- извлечение селезенки и сальника;
- извлечение влагалища, матки и яичников (у крупных животных с мочевым пузырем);
- извлечение желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкого и толстого кишечника;

- извлечение печени и поджелудочной железы;
- вскрытие брюшной аорты и передней брыжеечной артерии (у лошадей);
- извлечение почек (у мелких животных с мочеточниками и мочевым пузырем) и надпочечников;
- вскрытие ротовой полости, шеи, грудной полости и удаление их органов: языка, миндалин, пищевода, бронхиальных и средостенных лимфоузлов, гортани, трахеи, щитовидной и вилочковой железы, бронхов и легких, сердца;
- вскрытие черепной полости, извлечение головного мозга и исследование его;
- вскрытие носовой полости, придаточных полостей черепа;
- вскрытие спинномозгового канала, извлечение спинного мозга и его исследование;
- составление патолого-анатомического диагноза и заключения.

Во время вскрытия в необходимых случаях берут патологический материал для дополнительных лабораторных исследований (гистологического, микробиологического, химического и др.).

Прозектор может изменить план вскрытия в зависимости от анатомо-физиологических особенностей животных разных видов и возраста, целей вскрытия, характера болезни и обстоятельств гибели животного. Например, при смертельных травмах в первую очередь исследуют поврежденные органы, при смещениях кишечника – его пораженные участки и т. д. Принимают во внимание также удобства проведения вскрытия, например, для исключения септических заболеваний и изменений кровенаполнения селезенку и сердце вскрывают первыми; желудок и кишечник удобнее вскрывать последними, чтобы не загрязнять поле действия их содержимым.

2.3. Документация патолого-анатомического вскрытия: структура протокола патолого-анатомического вскрытия, правила оформления

Протокол патолого-анатомического вскрытия – основной ветеринарно-врачебный документ о причинах смерти животного. Он включает объективное описание всех изменений, обнаруженных во время патолого-анатомического исследования, специальное определение выявленных в процессе вскрытия прижизненных патологических изменений и заключение о причинах смерти.

Протокол патолого-анатомического вскрытия необходимо составлять непосредственно во время патолого-анатомического вскрытия под диктовку вскрывающего, так как при составлении протокола по памяти могут быть забыты и упущены важные детали и подробности.

Протокол патолого-анатомического вскрытия содержит следующие разделы:

- а) вводная часть;
- б) описательная часть, включающая в себя наружный и внутренний осмотры;
- в) заключительная часть, включающая патолого-анатомический диагноз, специальные (лабораторные) исследования и заключение о причине смерти животного (см. прил.).

Правила оформления вводной части протокола патолого-анатомического вскрытия

Во вводной части протокола указывают сведения о виде павшего или умертвленного животного, анамнестические данные, клиническую картину заболевания, клинический диагноз, условия содержания, кормления, ухода и эксплуатации животного, продолжительность болезни и лечение.

Также во вводной части обязательно фиксируют информацию об обстоятельствах вскрытия трупа животного: время и место вскрытия, информация о том, кем проводилось вскрытие.

Схема составления вводной части протокола может быть следующей:

1. Дата произведенного патолого-анатомического вскрытия.
2. Регистрационное описание трупа: вид животного, пол, возраст, порода, масть, кличка, инвентарный номер и пр.
3. Информация о владельце животного – фамилия и инициалы (Ф.И.О.), адрес владельца.
4. Место и дата вскрытия трупа.
5. Кем и в присутствии кого произведено вскрытие трупа – место работы, должность, фамилия и инициалы проводящего вскрытие и присутствующих.
6. Анамнестические и клинические данные:
 - а) условия содержания, кормления и эксплуатации животного в хозяйстве. Время заболевания, клинические признаки и способы лечения, длительность течения болезни животного. Вид оказанной ве-

ветеринарной помощи. Обстоятельства смерти, дата смерти, клинический (прижизненный) диагноз;

б) данные о ветеринарно-санитарном состоянии хозяйства: наличие среди животных инфекционных и неинфекционных болезней, клинико-анатомическая характеристика этих болезней, характер проведения лечебно-профилактических мероприятий.

Правила оформления описательной части протокола патолого-анатомического вскрытия

Описательная часть протокола состоит из двух разделов – наружного и внутреннего осмотра.

1) *наружный осмотр* производится до вскрытия естественных полостей трупа животного;

2) *внутренний осмотр* производится при вскрытии брюшной и грудной полостей, а также полости черепа трупа животного.

В описательной части протокола, составляемой на основании проведенного патолого-анатомического вскрытия, дается описание всех органов и тканей как измененных, так и неизмененных.

При описании обнаруженных патологических изменений необходимо соблюдать следующие правила:

- избегать применения специальных терминов, т. е. в описательной части недопустимы следующие фразы: «слизистая воспалена», «отек легких», «ткани гиперемированы», «участки некроза», «абсцесс». Одним из немногих патолого-анатомических терминов, использование которого не возбраняется, является термин «кровоизлияние». Не рекомендуется также употреблять в описательной части фраз: «в норме», «без изменений» и т. д.;

- материал излагают понятным языком, четко и объективно передающим картину увиденного, чтобы любой ветеринарный специалист, не присутствующий на вскрытии, без труда мог представить патолого-анатомические изменения органов по имеющемуся описанию;

- необходимо помнить, что при описании размеров органов и тканей, а также патологически измененных участков и очагов для их измерения используют линейку, указывая длину и ширину или диаметр в сантиметрах или миллиметрах. Является нежелательным сравнение размеров подобных участков с продуктами растительного и животного происхождения («величиной с горошину», «величиной с

лесной орех»; «величиной с перепелиное яйцо»). При возможности органы и ткани взвешивают. Объем содержащейся в полостях жидкости лучше определять в миллилитрах путем переливания в измерительный сосуд;

- описание внешнего вида органов и тканей необходимо производить в определенном порядке, при этом рекомендуется придерживаться схем, указанных ниже.

Схема описания компактных (паренхиматозных) органов

1. Размер (объем) определяется по состоянию краев, напряжению капсулы и выбуханию паренхимы из разрезанной капсулы или по результатам измерения и взвешивания.

2. Форма: общий вид и очертание, соотношение частей (долей) органа, характер краев (острые, тупые, закругленные).

3. Поверхность: форма поверхности (возвышение и углубления), влажность поверхности, блеск, цвет, степень наполнения кровеносных сосудов, наложения.

4. Вид поверхности разреза: рисунок строения, характер стекающей жидкости, соскоб с поверхности разреза (количество, консистенция).

5. Консистенция (органа в целом, отдельных частей участков или гнезд).

Схема описания полостных органов

1. Положение органа (нормальное или смещенное).

2. Размер (объем).

3. Форма.

4. Состояние серозной оболочки: рельеф поверхности, блеск, влажность, цвет, степень кровенаполнения сосудов.

5. Содержимое: количество, цвет, прозрачность, консистенция, структура (состав), запах, отношение к стенкам полости.

6. Слизистая оболочка: толщина, рельеф поверхности, цвет, характер секрета (наложений), степень кровенаполнения сосудов.

7. Состояние подслизистого и мышечного слоя (при необходимости): толщина, цвет, консистенция.

*Схема описания серозных полостей
(брюшной, грудной, тазовой, плевральной, перикардальной)*

1. Положение органов в полости: нормальное или смещенное.
2. Постороннее содержимое: количество, прозрачность, цвет, запах, консистенция, состав (примеси).
3. Серозные оболочки (брюшина, плевра, перикард): влажность, блеск, цвет, гладкость, наличие наложений и спаек.

*Схема описания патологических очагов в органах и тканях
(абсцессы, некрозы, воспаление, опухоли и др.)*

1. Локализация очагов.
2. Количество очагов.
3. Размеры (в мм или см).
4. Форма.
5. Цвет.
6. Консистенция.
7. Рисунок строения на разрезе.
8. Реакция со стороны окружающей ткани.

Наружный осмотр трупа животного

Наружный осмотр включает описание внешнего вида трупа до вскрытия естественных полостей, его положения, посмертных изменений, а так же поверхностно расположенных органов и тканей.

1. Общий вид трупа:

- а) телосложение – крепкое, слабое, пропорциональное, непропорциональное;
- б) упитанность – жирная, средняя, ниже средней, тощая;
- в) форма живота – вздутый, ровный, запавший;
- г) форма и симметричность сторон грудной клетки;
- д) вес и промеры трупа – при необходимости.

2. Естественные отверстия:

- а) *рот* – открыт или закрыт; чистота окружности, положение языка, прикус зубов; состояние слизистой оболочки ротовой полости: влажность, цвет, гладкость, наличие повреждений, наложений;
- б) *глаза* – глазная щель открыта или закрыта, чистота окружности (наличие выделений из глаз), состояние век (объем, цвет), содер-

жимое конъюнктивальных мешков (наличие постороннего содержимого), выпячивание или западание глазного яблока; роговица – прозрачная или мутная, цвет; состояние конъюнктивы – влажность, блеск, цвет, гладкость, степень наполнения кровеносных сосудов;

в) *уши* – состояние ушных раковин (подвижность, цвет, степень наполнения кровеносных сосудов), чистота наружного слухового прохода, содержимое в нем (наличие или отсутствие выделений);

г) *носовая полость* – наличие истечений, загрязнений, состояние слизистой оболочки – объем, цвет, влажность;

д) *анус (у птиц клоака)* – открыт или закрыт; загрязнение шерсти вокруг ануса каловыми массами (вид и качество загрязнений), выпячивание прямой кишки; состояние слизистой оболочки – влажность, цвет, гладкость, наличие повреждений, наложений;

д) *наружные половые органы*. У самок описывают *вагалище с преддверием*: половая щель – степень открытости, чистота окружности, наличие истечений (характер истечений); состояние слизистой оболочки – влажность, блеск, цвет;

У самцов описывают *состояние препуция и мошонки* (если животное кастрировано, это необходимо указать) – чистота окружности, цвет, влажность и гладкость поверхности, степень наполнения кровеносных сосудов; *состояние полового члена* – наличие истечений (характер истечений); цвет, влажность и гладкость поверхности, степень наполнения кровеносных сосудов, проходимость канала; состояние слизистых оболочек – влажность, цвет, блеск.

3. Наружные покровы:

а) *шерстный, волосяной, перьевого покров* – густота, блеск (тусклость), чистота, степень прилегания к кожным покровам (гладкий, взъерошенный), степень прочности удержания в волосяных луковицах при выдергивании (хорошо или плохо удерживается), необходимо помнить, что у некоторых диких и домашних животных плохая удерживаемость волосяного и шерстного покрова является анатомической особенностью (например, у косуль, северных оленей);

б) *кожные покровы* – толщина, эластичность, влажность, цвет, наличие повреждений (язв, ран, рубцов) и патологических образований (сыпи, гнойничков, корочек, кровоизлияний), которые описывают по схеме описания патологических очагов;

в) *роговые образования кожи (рога, копыта, когти)* – форма (нормальной формы или деформированы), структура (слоистая, однородная, крошащаяся), твердость (твердые или мягкие), цвет;

г) у птиц описывают также *производные кожи в области головы*: бородки, сережки, гребень – форма, размер, характер поверхности цвет.

4. *Подкожная клетчатка* – количество жира, его цвет, кровенаполнение сосудов, сухость, влажность, наличие отеков, кровоподтеков.

5. *Поверхностные лимфатические узлы* (подчелюстные заглоточные, поверхностные шейные, надколенные, подколенные, поверхностные паховые или надвыменные) – величина, вес (при необходимости), форма, и гладкость поверхности, влажность, цвет, блеск; на разрезе – рисунок ткани (выражен, не выражен), характер стекающей с поверхности разреза жидкости (если есть), консистенция органа. Отдельно отмечают срастание лимфоузлов с окружающей тканью.

6. *Слюнные железы* – размер, цвет с поверхности и на разрезе, консистенция.

7. *Скелетная мускулатура* – величина (нормальные размеры, уменьшение или увеличение в объеме), форма (если есть изменения), цвет, на разрезе определяют – цвет, влажность, выраженность рисунка волокнистого строения, состояние межмышечной соединительной ткани; консистенция (мягкая, плотная, упругая, дряблая).

8. *Кости, суставы, сухожилия*:

а) *кости* – величина (нормальные размеры, уменьшение или увеличение), конфигурация (нормальная или изменена), твердость (твердые или мягкие); состояние надкостницы – гладкость поверхности, цвет; состояние костной ткани – структура, цвет, прочность на излом; состояние костного мозга – цвет, структура, консистенция;

б) *суставы* – конфигурация (нормальная или изменена); состояние окружающей ткани и капсулы – объем, цвет, влажность, консистенция; суставные поверхности костей и синовиальные оболочки суставов – гладкость, блеск, цвет, наличие синовиальной или другой жидкости (ее количество, прозрачность, цвет, консистенция);

в) *сухожилия* – объем, цвет, прочность, структура, прочность соединения с костями.

9. *Молочные железы* – физиологическое состояние, размер, консистенция, состояние сосков, содержимое при надавливании (количество, цвет, прозрачность, консистенция, структура).

10. *Трупные изменения*:

а) *трупное охлаждение* – труп холодный или теплый (при необходимости температура трупа измеряется);

б) *трупное окоченение* – хорошо или слабо выражено, отсутствует, степень выраженности окоченения в мышечных группах;

в) *трупные пятна* (гипостазы и имбибиция) – расположение, величина, форма, цвет, изменение цвета при надавливании, изменение положения при переворачивании трупа (при необходимости);

г) *посмертное свертывание крови* – степень свертывания, консистенция, цвет, форма и легкость отделения свертков крови;

д) *трупное разложение* (аутолиз и гниение) – наличие или отсутствие, локализация, степень проявления, цвет, запах, наличие газов в естественных полостях и тканях, рисунок ткани, отсутствие реакции со стороны окружающей или подлежащей ткани.

Внутренний осмотр трупа животного

Внутренний осмотр включает описание внешнего вида органов и тканей при вскрытии естественных полостей трупа животного (грудной, брюшной, полости черепной коробки).

Описание следует проводить по какой-либо определенной системе: либо сверху вниз, как проводилось вскрытие, либо по системам органов (органов дыхания, пищеварения, кровообращения) или по естественным полостям (органы грудной полости, брюшной полости, черепной полости). В первую очередь вскрывают и описывают паренхиматозные органы, желудочно-кишечный тракт вскрывают в последнюю очередь, для того, чтобы содержимым кишечника не загрязнять остальные органы.

11. Брюшная полость (у птиц грудобрюшная):

а) *положение органов* – анатомически правильное (нормальное), анатомически неправильное (смещенное), при смещении органов указывают их топографию;

б) *постороннее содержимое* – количество, цвет, прозрачность, запах, консистенция, состав;

в) *состояние пристеночной и висцеральной брюшины* – влажность (сухость), блеск, цвет, наличие наложений, спаек.

12. Сальник и брыжейка:

а) *сальник* – количество жира, цвет жира;

б) *брыжейка* – толщина, цвет, прозрачность, степень наполнения кровеносных, наложения (количество, цвет, консистенция, структура).

13. Диафрагма – уровень стояния купола (нормальное, краниальное, каудальное стояние) или указывается уровень стояния по от-

ношению к ребрам; целостность, цвет, толщина мышечной части, наличие разрывов, вид краев разрыва.

14. Грудная полость: положение органов – правильное (нормальное), неправильное (смещенное), указывается топография смещенных органов; постороннее содержимое – количество, консистенция, цвет, прозрачность, состав; состояние реберной и легочной плевры, средостение – влажность, сухость, блеск, шероховатость, цвет, прозрачность, наличие наложений спаек, кровенаполнение сосудов.

Воздухоносные мешки у птиц – толщина стенок, блеск, прозрачность, цвет, содержимое, его характер.

15. Перикард:

а) состояние перикарда – гладкость, (гладкий или шероховатый), влажность, блеск, цвет, прозрачность, наличие наложений, спаяк;

б) положение сердца – нормальное или смещенное;

в) постороннее содержимое – состав, количество, консистенция, цвет, прозрачность, запах.

Кровь и органы кроветворения

16. Кровь в крупных сосудах и в полостях сердца: количество, цвет, степень свертывания (плотные или рыхлые свертки, жидкая кровь).

17. Глубокие лимфатические узлы (бронхиальные, средостенные, желудка, брыжеечные, порталные, селезеночные, околопочечные) – величина (размеры в см.), форма, консистенция, цвет и гладкость поверхности, влажность; поверхность разреза – цвет, блеск, рисунок ткани, характер стекающей на разрезе жидкости.

Отдельно указывают срастание отдельных пакетов между собой и с окружающей тканью.

18. Селезенка:

а) величина (длина, ширина, толщина в см, вес при необходимости);

б) форма – края (острые, округлые), капсула – напряженная или сморщенная, цвет, блеск, гладкость;

г) поверхность разреза – выбухание пульпы, цвет, вид поверхности разреза (гладкий, зернистый), выраженный или затушеванный рисунок фолликулов и трабекул, количество и вид соскабливаемой пульпы;

в) консистенция – плотная, упругая, мягкая, дряблая;

19. Костный мозг плоских и трубчатых костей – цвет, консистенция, структура, наличие очаговых изменений.

20. *Миндалины* – величина, рельеф поверхности (гладкие, бугристые), влажность, цвет; поверхность разреза – наличие выделений с поверхности разреза, рисунок строения на разрезе; консистенция.

21. *Фабрициева бурса* (у птиц) – размер, форма, цвет поверхности и на разрезе, постороннее содержимое в ее полости, консистенция.

22. *Тимус* (у молодых животных) – размер, вес (при необходимости), форма, консистенция, цвет, рисунок строения ткани на разрезе.

Сердечно-сосудистая система

23. *Сердце:*

а) размеры, вес (при необходимости), форма (анатомически правильная, округлая, вытянутая, каплевидная), рельеф поверхности (гладкое, бугристое, шершавое), влажность, блеск, цвет эпикарда, наличие наложений;

б) состояние эпикардильной жировой клетчатки – количество, цвет, консистенция жира, степень кровенаполнения коронарных сосудов;

в) миокард – толщина, соотношение толщины стенок правого и левого желудочков (в норме 1:3), цвет, выраженность рисунка волокнистого строения на разрезе, консистенция;

г) размеры и содержимое сердечных полостей (жидкая кровь, свертки крови и т. д.);

д) состояние пристеночного эндокарда и клапанов – толщина, эластичность, гладкость, влажность, блеск, прозрачность, цвет.

24. *Крупные кровеносные сосуды* (аорта, сонные артерии, яремные и полые вены и др.) – содержимое сосудов: количество, цвет, прозрачность, консистенция, прикрепление свертков крови к стенке сосуда; стенки сосудов: толщина, эластичность, цвет и гладкость внутренней поверхности (интимы), наличие аневризм, варикозов, тромбов.

Органы дыхания

25. *Носовая полость:* содержимое (если имеется) – количество, консистенция, цвет, состав; слизистая оболочка – толщина (набухание), цвет, наличие наложений; состояние носовых раковин, носовой перегородки и придаточных носовых пазух – их симметричность на поперечном распиле, проходимость носовых ходов.

26. *Гортань, трахея, бронхи:* хрящи и хрящевые кольца – эластичность, состояние просвета (просвет нормальный, суженный, расширенный, деформированный); постороннее содержимое в просвете (пенистая жидкость, слизь, кормовые массы и пр.) – количество, цвет,

прозрачность, консистенция, структура, легкость удаления (удаляется легко, удаляется с трудом, смывается водой); слизистая оболочка – толщина (не изменена, набухшая), влажность, блеск, цвет, наложения.

27. Легкие:

а) объем – (спавшиеся, не вполне спавшиеся, не спавшиеся), вес (при необходимости);

б) форма и конфигурация частей (если изменена);

в) легочная плевра – толщина, гладкость, влажность, блеск, прозрачность, цвет, наложения, спайки, легкость отделения (отделяется легко или с трудом), содержимое плевральных полостей (количество, цвет, прозрачность);

г) консистенция легких – (эластичная, тестоватая; плотная, крепящая), топография участков измененной консистенции;

д) цвет поверхности, цвет на разрезе;

е) поверхность разреза – состояние паренхимы (рисунок дольчатого строения: выражен, усилен, стерт); состояние стромы (толщина, цвет, консистенция); состояние бронхов (толщина, цвет, слизистая оболочка); состояние кровеносных сосудов (степень кровенаполнения), вид жидкости, стекающей с поверхности разреза и бронхов (пенистая, кровянистая, слизистая или гнойная);

ж) проба на воде (воздухонаполнение) – кусочки легкого легко плавают, плавают, погрузившись в воду, тонут.

При наличии в легких очаговых поражений (некроз, воспаление и др.) отмечают их топографию (в долях), количество, величину, форму, консистенцию, цвет, рисунок строения, реакцию окружающей среды (светлеют на воздухе).

Органы пищеварения

28. Ротовая полость – состояние слизистой оболочки щек, десен, твердого и мягкого неба, губ: влажность, блеск, цвет, складчатость, повреждение; состояние зубов: гладкость, цвет, наложения, степень удерживаемости, отсутствие (указать топографию отсутствующих зубов), состояние прикуса (смыкание зубных аркад).

29. Язык – расположение в ротовой полости, толщина, размеры (при необходимости), цвет, состояние слизистой оболочки и мышечной ткани (консистенция, цвет, рисунок волокнистого строения мышцы).

30. Глотка и пищевод (у птиц описывают зоб) – проходимость, содержимое (количество, вид), состояние слизистой оболочки: влаж-

ность, блеск, цвет, складчатость, повреждение, состояние подслизистой и мышечной оболочек (при необходимости).

31. *Желудок* (у жвачных – преджелудки и сычуг, у птиц – железистый и мышечный желудки):

а) положение (нормальное или смещенное), величина, форма;

б) наполнение (пустой, умеренно или сильно наполнен кормовыми массами, вздут газами), содержимое – количество, консистенция, цвет, запах, состав, легкость отделения от стенок, проходимость входа и выхода;

в) толщина стенок: состояние серозной и мышечной оболочек (цвет, блеск, рисунок, наложения);

г) состояние слизистой оболочки: толщина, складчатость (складки расправляются или не расправляются), цвет, влажность, наложения, легкость отделения наложений от слизистой оболочки (смываются водой, отделяются с трудом), повреждения: эрозии, язвы (топография, количество, размер, цвет, характер краев).

32. *Кишечник*:

а) *тонкий кишечник* (двенадцатиперстная, тощая и подвздошная кишки): положение – нормальное или смещенное (заворот, инвагинация, выпадение и пр.); наполнение – пустой, умеренно или сильно наполнен пищевыми массами, вздут газами; состояние серозных покровов (влажность, блеск, цвет, наложения, степень кровенаполнения сосудов); содержимое – количество химуса, консистенция, цвет, запах, состав; проходимость кишечника; слизистая оболочка – толщина, складчатость (складки расправляются или не расправляются), влажность, цвет, наложения (отделяются легко или с трудом); пейеровы бляшки – размер, форма, цвет, консистенция; состояние подслизистой, мышечной и серозной оболочек (толщина, цвет, рисунок наложения);

б) *толстый кишечник* (слепая, ободочная и прямая кишки): положение нормальное или смещенное (заворот, инвагинация, выпадение и пр.); наполнение – пустой, умеренно или сильно наполнен каловыми массами, вздут газами; состояние серозных покровов (влажность, блеск, цвет, наложения, степень кровенаполнения сосудов); содержимое – количество каловых масс, консистенция, цвет, запах, состав; проходимость кишечника; слизистая оболочка – толщина, складчатость (складки расправляются или не расправляются), консистенция, влажность, цвет наложения; солитарные фолликулы – раз-

мер, форма, цвет, консистенция; состояние подслизистой, мышечной и серозной оболочек (толщина, цвет, рисунок наложения и пр.).

33. Печень:

а) размер (не увеличена, уменьшена, увеличена), при необходимости – длина, ширина, толщина, вес; характер краев (острые и притупленные края); форма органа, состояние поверхности (гладкая, бугристая, узловатая, зернистая); фиброзная капсула (напряжение капсулы, прозрачность, цвет);

б) блеск, влажность, цвет поверхности; выраженность дольчатого строения с поверхности и на разрезе (окраска центральных и периферических частей печеночных долек); блеск и влажность поверхности разреза; выбухание паренхимы на разрезе; характер жидкости, стекающей с поверхности разреза органа; консистенция – плотная, мягкая, ломкая, дряблая; количество соскоба с поверхности разреза – скудный, обильный, умеренный; характер соскоба – кашицеобразный, жидкий, кровянистый.

в) состояние желчных протоков – толщина стенки, содержимое (количество, цвет, консистенция, состав), цвет;

г) желчный пузырь – величина, содержимое (количество, цвет, консистенция), состояние слизистой оболочки (толщина, цвет, наложения), проходимость желчного протока.

34. Поджелудочная железа – размеры (вес), форма, консистенция, цвет, выраженность дольчатого строения, вид поверхности разреза.

Органы выделительной системы

35. Почки:

а) состояние околопочечной клетчатки, количество жира в околопочечной клетчатке; фиброзная капсула – прозрачность, влажность, цвет, напряжение, легко или с трудом отделяется;

б) размер (длина, ширина, толщина), вес; форма органа и его поверхность (гладкая, зернистая, бугристая), цвет поверхности;

в) поверхность разреза – выбухание паренхимы на разрезе, цвет коркового и мозгового слоев, четкость границ между ними, ширина слоев (при необходимости), влажность, блеск, видимость почечных клубочков; консистенция (плотная, упругая, мягкая);

г) почечные лоханки – объем полостей, содержимое почечных лоханок (количество, цвет, консистенция), состояние слизистой оболочки (толщина, цвет, рельеф поверхности, наложения);

д) мочеточники – проходимость (сохранена, нарушена); величина диаметра просвета (сужен, нормальный, расширен); характер содержимого, состояние слизистой оболочки (толщина, цвет, рельеф поверхности, наложения).

36. *Мочевой пузырь* – состояние серозных покровов (влажность, блеск, цвет, наложения, степень кровенаполнения сосудов); степень наполнения (пустой, умеренно наполнен, растянут); моча – количество, цвет и консистенция; толщина стенки, состояние слизистой оболочки (толщина, цвет, рельеф поверхности, наложения).

37. *Мочеиспускательный канал* – проходимость, величина диаметра просвета (сужен, нормальный, расширен); содержимое, состояние слизистой оболочки (толщина, цвет, рельеф поверхности, наложения).

Половые органы

38. *Яичники* – величина, вес (при необходимости), форма, цвет, наличие желтых тел, консистенция.

39. *Яйцеводы* (у птиц яйцевод) – проходимость (сохранена, нарушена); содержимое (количество, цвет и консистенция); состояние слизистой оболочки (толщина, цвет, рельеф поверхности, наложения).

40. *Матка* – положение (анатомически правильное или смещенное), размеры, форма, объем полости матки и рогов, толщина стенки, количество и характер содержимого (жидкость, плодные оболочки, плод); состояние слизистой оболочки – толщина, влажность, цвет, складчатость, вид карбункулов, наложения; состояние мышечного слоя и серозной оболочки.

41. *Влагалище* – количество и характер содержимого; состояние слизистой оболочки – толщина, складчатость, влажность, наложения, состояние мышечного слоя.

42. *Молочные железы* – физиологическое состояние, размер, вес (при необходимости), объем отдельных долей, форма, консистенция, наполнение сосудов на разрезе, цвет на разрезе, влажность, характер стекающей жидкости (количество, цвет, прозрачность, консистенция, структура), рисунок ткани на разрезе (соотношение железистой ткани и стромы), состояние молочных цистерн и протоков.

43. Семенники и их придатки:

а) состояние мошонки – поверхность, цвет, степень кровенаполнения сосудов, повреждения;

б) семенник – расположение, форма, цвет и вид поверхности разреза семенников и их придатков, консистенция; семенной канатик (при необходимости).

44. *Придаточные половые железы* (простата, семенные пузырьки и куперовы железы) – размер, форма, цвет, вид поверхности разреза, консистенция.

45. *Половой член и препуций* – форма, проходимость мочеиспускательного канала и содержимое в нем, состояние слизистой оболочки (толщина, складчатость, влажность, цвет).

Нервная система

46. *Головной мозг и его оболочки:*

а) *твердая мозговая оболочка* – напряжение, толщина, гладкость, блеск, цвет, кровенаполнение сосудов, консистенция;

б) *мягкая мозговая оболочка* – гладкость, влажность, блеск, толщина, прозрачность, цвет, кровенаполнение сосудов, консистенция;

в) *головной мозг* – размер, вес, форма, вид мозговых извилин, глубина борозд, консистенция на разрезе, влажность, блеск, четкость границ между серым и белым веществом, кровенаполнение сосудов, характер стекающей с поверхности разреза жидкости;

г) *мозговые желудочки* – объем, количество и характер содержимого, цвет и степень кровенаполнения сосудистых сплетений.

47. *Спинальный мозг и его оболочки (при необходимости):*

а) *твердая и мягкая оболочки спинного мозга* описываются так же, как и оболочки головного мозга;

б) *ткань спинного мозга* – консистенция, цвет, рисунок строения белого и серого вещества.

48. *Нервы и нервные узлы* (при необходимости) – размеры, вид, консистенция, цвет.

Железы внутренней секреции

49. *Надпочечники* – размер, вес (при необходимости), форма, консистенция; на разрезе – цвет и выраженность границы между корковым и мозговым веществом.

50. *Щитовидная железа* – размер, вес (при необходимости), форма, цвет, консистенция, рисунок строения ткани на разрезе.

51. *Паращитовидные железы, гипофиз, эпифиз* – описываются при необходимости: размер, вес (при необходимости), форма, цвет, консистенция, рисунок строения ткани на разрезе.

Заключительная часть протокола патолого-анатомического вскрытия

Заключительная часть протокола включает следующие пункты:

- 1. Специальные (лабораторные) исследования.*
- 2. Патолого-анатомический диагноз.*
- 3. Заключение.*

Специальные (лабораторные) исследования

Результаты лабораторных исследований (гистологического, бактериологического, биохимического (биопробы), химического и других лабораторных исследований) заносят в протокол вскрытия после патолого-анатомического диагноза, при получении из лаборатории подтверждающего документа. При отправке патолого-анатомического материала в лаборатории для исследования составляется сопроводительное письмо.

Патолого-анатомический диагноз

Патолого-анатомический диагноз представляет собой перечисление в определенном порядке обнаруженных патолого-анатомических изменений в органах и тканях с применением специальной терминологии, посмертные (трупные) изменения в патолого-анатомический диагноз не включаются.

Перечисление патологических процессов производят в порядке их патогенетической взаимозависимости (важности):

- на первом месте ставят изменения, являющиеся главной причиной смерти животного или характеризующие основное заболевание (т. е. вначале перечисляют группу процессов, типичных (патогномоничных) для основной болезни);
- затем указывают изменения, осложняющие основное заболевание, способствующие его развитию и ускоряющие смерть животного;
- на последнем месте ставят изменения, не имеющие прямого отношения к смерти животного (сопутствующие патологические процессы).

Заключение

Заключение является пунктом протокола вскрытия, в котором прозектор делает вывод о причине смерти, этиологической и патогенетической взаимосвязи установленных болезней и патологических процессов.

Заключение формируется на основании результатов вскрытия трупа, анализа анамнестических и клинико-эпизоотологических данных, результатов лабораторных исследований.

Для точного заключения необходимо определить две причины смерти: *опосредованную* (определяющую или основную) и *непосредственную* (ближайшую).

Заключение о причине смерти животного должно быть *нозологическим*, т. е. в нем необходимо указать:

- *основную болезнь* (инфекционную или неинфекционную), обусловившую смерть;

- *ее осложнение*, если оно выявлено;

- *сопутствующие болезни*;

- *непосредственную (ближайшую) причину смерти*, например: «На основании анализа результатов патолого-анатомического вскрытия трупа, гистологического и вирусологического исследований, клинико-эпизоотологических данных установлено, что смерть свиньи наступила от чумы свиней, осложненной сальмонеллезом, в результате чего наступила интоксикация организма, сердечная недостаточность, развившаяся на ее фоне острая застойная гиперемия и отек легких, приведших к асфиксии».

Написание развернутого заключения, составленного с расшифровкой динамики механизма смерти, получило *название танатологического заключения* (от греч. *танатос* – смерть), при этом в заключении наряду с основной болезнью (нозологической формой) и непосредственной причиной смерти животного необходимо указать причины, вызвавшие данную болезнь, например: «На основании клинических данных и результатов патолого-анатомического вскрытия установлено, что смерть коровы наступила от асфиксии (непосредственная причина смерти) на почве острой тимпании рубца (основная причина смерти), развившейся вследствие поедания животным мерзлого картофеля (причина, вызвавшая данную болезнь)».

Следовательно, развернутое заключение, составленное по *нозологическому и танатологическому принципам*, где раскрывают как определяющую (основную болезнь), так и непосредственную причину смерти, является наиболее полным и в ряде случаев может быть окончательным заключением о наступлении смерти.

Контрольные вопросы

1. Каковы цели и значение патолого-анатомического вскрытия трупов животных?
2. Кто имеет право осуществлять патолого-анатомическое вскрытие трупов животных?
3. Какие основные требования предъявляют к месту патолого-анатомического вскрытия трупов животных?
4. Какие основные требования предъявляют к спецодежде и инструментам для патолого-анатомического вскрытия трупов животных?
5. Каковы правила обращения с инструментами для патолого-анатомического вскрытия?
6. Перечислите основные правила общественной и личной безопасности при работе с трупным материалом.
7. Из каких разделов состоит протокол патолого-анатомического вскрытия?
8. Каким образом производят описание размеров органов, тканей, патологически измененных участков и очагов?
9. Что такое патолого-анатомический диагноз? Каковы правила его составления?

ТЕМА 3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ И РЕСТАВРАЦИЯ ВЛАЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ

3.1. Техника изготовления влажных музейных препаратов

При проведении патолого-анатомического вскрытия и обнаружении выраженных характерных для того или иного патологического процесса изменений, студентам рекомендуется изготовить наглядное пособие для патолого-анатомического музея кафедры в виде влажного препарата.

Для изготовления влажных препаратов используют следующую методику, включающую этапы:

- 1) фиксация в формалино-солевой смеси;
- 2) промывание в проточной воде;
- 3) восстановление цвета ткани в этиловом спирте;
- 4) помещение в раствор для хранения;
- 5) герметизация в емкости для хранения.

Подготовка органа и тканей для консервации

Первое и основное правило при изготовлении музейных препаратов – избегать всякого обмывания органов водой.

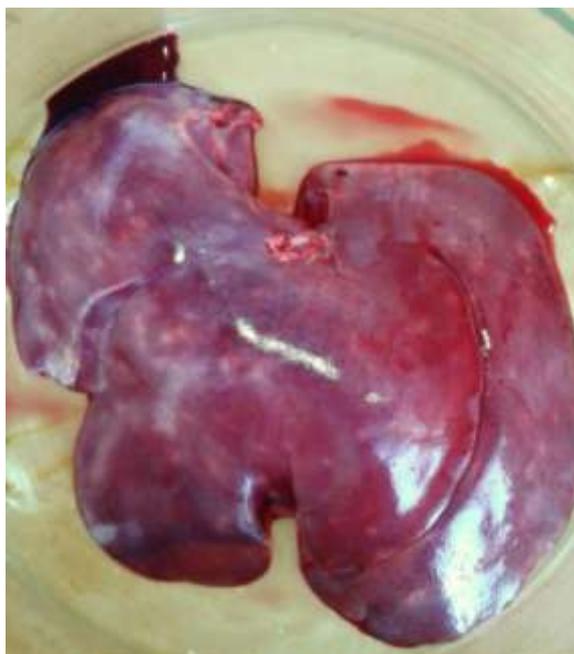
Перед тем как поместить препарат в фиксирующую среду, его необходимо подготовить соответствующим образом:

1) объект тщательно препарируют, удаляя все лишнее и максимально отчетливо выявляя детали патологического процесса; делают разрезы и придают желательное для демонстрации положение;

2) различные полости, трубчатые образования, каналы и свищи заполняют сухой ватой, а где нужно ставят деревянные или стеклянные распорки;

3) куски кожи, вскрытые петли кишок, желудок, сальник, твердую мозговую оболочку аккуратно расправляют, растягивают на толстом картоне или фанере и закрепляют с помощью лигатур или игл.

Только после такой подготовки препарат помещают в фиксирующую жидкость (рис. 16). Необходимо помнить, что нельзя делать никаких значительных исправлений в препарате после того, как он пробыл в фиксаторе хотя бы 1–2 суток.



*Рисунок 16 – Орган, подготовленный для фиксации
(печень свиньи с участками некрозов)*

Фиксация

Препарируемые органы и ткани фиксируют в формалино-солевой смеси, в которой гемоглобин крови переходит в метгемоглобин, благодаря чему органы принимают бурую окраску.

Для достижения положительных результатов фиксации необходимо соблюдать следующие условия:

1) объем фиксирующей жидкости должен в 5–10 раз превышать объем препарата;

2) нельзя допускать контакта фиксируемых препаратов со стенками посуды, а потому их обязательно кладут на вату, изолируя при этом и от боковых стенок;

3) препарат должен лежать в жидкости свободно. Если в одну и ту же посуду приходится помещать сразу несколько объектов, их обязательно перекладывают ватой и располагают таким образом, чтобы они не оказывали друг на друга значительного давления;

4) препараты, всплывающие на поверхность жидкости, покрывают ватой или сложенной в несколько слоев марлей, которые предварительно смачивают фиксирующей жидкостью;

5) фиксирующая жидкость должна быть совершенно прозрачной, при окрашивании ее кровью, помутнении или загрязнении, необходимо заменить ее на свежую.

Через 1–2 дня после пребывания препарата в фиксаторе можно извлекать все посторонние предметы, введенные в полости, каналы и трубчатые образования.

Виды и рецептура формалино-солевых смесей

Общим для всех формалино-солевых растворов является то, что они замедляют уплотнение препарата и сохраняют на более продолжительное время способность тканей к восстановлению окраски.

Наиболее употребительны следующие фиксирующие формалино-солевые смеси:

1. Н.Ф. Мельникова-Разведенкова (рис. 17, 18):

- формалин – 100 мл;
- хлористый калий – 5 г;
- уксуснокислый калий (или натрий) – 30 г;
- вода – 1000 мл.

2. Кайзерлинга:

- формалин – 200 мл;
- азотнокислый калий (селитра) – 15 г;
- уксуснокислый калий – 30 г;
- вода – 1000 мл.

3. Пика:

- формалин – 50 мл;
- карлсбадская соль (искусственная) – 50 г;
- вода – 1000 мл.

4. Иореса:

- формалин – 100 мл;
- сернокислый натрий – 20 г;
- сернокислая магнезия – 20;
- поваренная соль – 10;
- вода – 1000 мл.

Для приготовления указанных жидкостей берут водопроводную воду (рис. 18, 19).

Слабые (по концентрации формалина) растворы обладают более глубоким проникающим действием и поэтому они лучше для фиксации крупных объектов, но так как гемолизирующее действие таких растворов выше, они менее эффективны в отношении восстановления естественной окраски. С последней точки зрения выгоднее крепкие

формалиновые жидкости. Поэтому там, где главной задачей является сохранение окраски препарата, последний фиксируют в жидкости Кайзерлинга, как наиболее крепкой. Когда такая окраска имеет второстепенное значение и орган крупный, показаны слабые фиксаторы, например жидкости Н.Ф. Мельникова-Разведенкова, Пика и др.



Рисунок 17– Ингредиенты для изготовления фиксирующей смеси (по Н.Ф. Мельникову-Разведенкову)



Рисунок 18 – Изготовление фиксирующей смеси: подготовка емкостей и составляющих смесь ингредиентов



Рисунок 19 – Изготовление фиксирующей смеси: смешивание воды и формалина

Богатые кровью органы в целях наиболее полного восстановления окраски желательно фиксировать в крепких формалиново-солевых рас-

творях. Впрочем, в отношении крупных объектов одно лишь применение слабых формалиново-солевых жидкостей ни в какой мере не обеспечивает полноценной фиксации и потому, как правило, перед погружением препаратов в фиксирующий раствор приходится прибегать к дополнительным разрезам, надрезам и вколам (рис. 20, 21).

Надрезы и вколы делают в малозаметных местах органа, не подлежащих демонстрации; в разрезы и вколы вводят тонкие ватные или марлевые тампоны. Однако и разрезы далеко не всегда гарантируют хорошую фиксацию всей тканевой массы большого объекта, по этой причине иногда ограничиваются только частью органа в виде пластин или ломтей той или иной толщины. Пользуясь пластинами, можно шире применять жидкость Кайзерлинга.

Прибегают также к впрыскиванию фиксирующего раствора в толщу органа. Впрыскивание делают как до помещения препарата в фиксатор, так и после, спустя несколько дней.

В некоторых случаях эффективнее введение фиксирующей жидкости в сосуды. Фиксацию через сосуды рекомендуют в следующих случаях:

- 1) когда нужно сохранить всю тканевую массу объекта, а не его окраску;
- 2) при некоторых патологических пигментациях (например, угольной).

Для наливки используют большие шприцы Жанэ (можно использовать и воронку, по принципу сифона).

Сосуд, через который вводилась фиксирующая жидкость, перевязывают. Вводить жидкость лучше всего через артерии, но можно и через вены, лишь бы они были проходимы и не содержали кровяных свертков; орган при этом заметно набухает. Количество вводимой в сосуды жидкости должно быть приблизительно равно весу того органа, который подвергается обработке (качество наливки органа будет выше, если фиксатор вводить попеременно сначала через один сосуд (артерию), потом через другой (вену)).

Для сохранения внешнего вида больших объектов прибегают к удалению центральных, а потому плохо фиксирующихся участков органа путем выскабливания (острой ложкой) через широкое окно, сделанное на стороне препарата, не подлежащей демонстрации. Такое выскабливание делают после того, как препарат пролежал в фиксирующей жидкости не менее 3–5 дней. Образовавшуюся полость заполняют сухой ватой, а затем орган вновь помещают в фиксирующую

жидкость, добиваясь хорошей фиксации сохранившегося периферического слоя (рис. 22–25).



Рисунок 20 – Подготовка органа к фиксации: вскрытие полостей сердца (сердце лося)

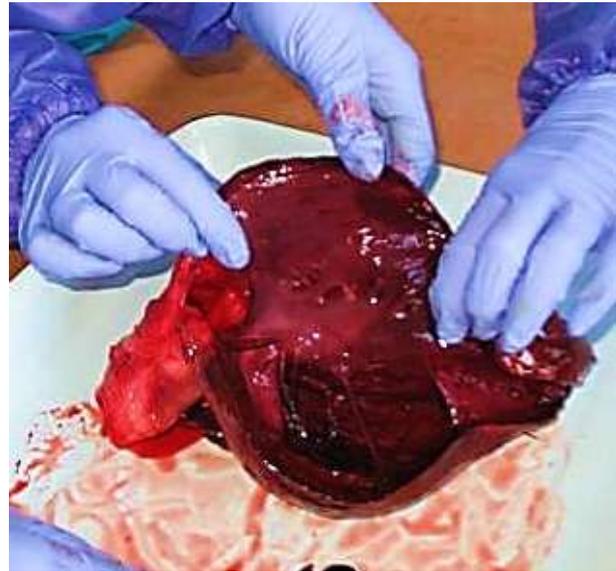


Рисунок 21 – Подготовка органа к фиксации: вскрытие полостей сердца и заполнение их ватными тампонами (сердце лося)



Рисунок 22 – Подготовка органа к фиксации: вскрытие полостей сердца и заполнение их ватными тампонами для сохранения формы и объема (сердце лося)



Рисунок 23 – Помещение органа в сосуд с фиксирующим раствором (сердце лося)

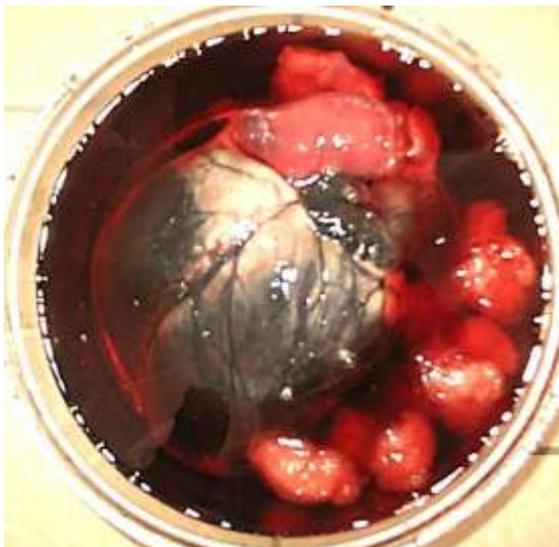


Рисунок 24 – Орган, помещенный в сосуд с фиксирующим раствором



Рисунок 25 – Орган, помещенный в сосуд с фиксирующим раствором через 72 часа после начала фиксации, перед первой заменой раствора (сердце лося)

Сроки фиксации органов и тканей

Время пребывания препаратов в формалиново-солевом растворе различно и зависит от многих условий:

- 1) от величины и плотности объекта;
- 2) количества и глубины сделанных разрезов и надрезов;
- 3) свежести и крепости фиксатора, температуры.

Различные тонкостенные органы, например, петли кишок, желудок, желчный и мочевой пузыри, достаточно держать в жидкости 12–24 часа; такие органы как почки, сердце, легкие и селезенка (нормальных размеров или немного увеличенные и обязательно разрезанные) от 3–4 и до 7 дней; мозг и печень (с разрезами) – до 3–4 недель (рис. 26–28).

Критерием достаточной фиксации служит равномерное уплотнение объекта и отсутствие на контрольном разрезе красноватых и розовых участков; с поверхности разреза не должно выдавливаться кровянистой жидкости.

Передержка препарата в фиксаторе может в дальнейшем неблагоприятно отразиться на качестве восстановления окраски.

Посуда, в которой хранятся препараты, покрывается простым стеклом соответствующих размеров. Желательная температура помещения около 18 °С. Во избежание химической травмы рук работают в резиновых перчатках.



Рисунок 26 – Первая замена фиксирующей смеси через 72 часа после начала консервации (легкие собаки в состоянии острой застойной гиперемии)



Рисунок 27 – Орган, помещенный в сосуд с фиксирующим раствором через 144 часа после начала фиксации: после второй замены фиксирующего раствора и введением свежих ватных тампонов в полости крупных сосудов, предсердия и желудочки (сердце лося)



Рисунок 28 – Вторая замена фиксирующей смеси через 144 часа после начала консервации (печень свиньи с участками некрозов)

Замечания по разрезам и фиксации некоторых органов

Головной мозг. Чаще готовят препараты из отдельных ломтей (пластин) головного мозга, которые получают при некоторых классических способах вскрытия, например, при горизонтальных разрезах по Флексигу и фронтальных – по Питре и Фишеру. Такие пластины фиксируют в короткие сроки.

Спинной мозг. Вскрывают по задней поверхности твердую мозговую оболочку. Никаких специальных разрезов собственного вещества мозга не делают за исключением тех, которые необходимы для выявления и демонстрации патологического процесса.

Перед погружением в фиксатор препарат предварительно раскладывают на картоне или тонкой дощечке, тщательно расправляют вскрытую твердую оболочку и укрепляют ее при помощи игл или лигатур. Продолжительность фиксации – 1–2 дня.

Сердце. Сроки фиксации от 3–4 до 7–8 дней, в зависимости от толщины стенок желудочков.

Легкие. Пользуются теми же разрезами, что и на вскрытии, а именно – по длиннику органа, от наружной выпуклой поверхности и до ворот легкого. Направление разреза должно быть таким, чтобы крупные бронхи и сосуды вблизи корня легкого были, по возможности, разрезаны вдоль.

Хорошие результаты дает фиксация органа (целого легкого или одной доли) посредством вливания фиксирующей жидкости (при помощи шприца Жанэ) в дыхательные пути. Фиксатор (лучше более слабый) вливают осторожно, под небольшим давлением, до умеренного растяжения органа; после этого перевязывают бронх и помещают препарат в формалиново-солевой раствор.

Сроки фиксации различны: для объектов с воздушной паренхимой (при наличии разрезов) достаточно нескольких дней, при всякого рода уплотнениях – до 7–10 дней. Для этого органа особенно показана фиксация в жидкости Кайзерлинга.

Желудочно-кишечный тракт. Для приготовления музейных препаратов пользуются теми же разрезами, что и на вскрытии, т. е. пищевод вскрывают по задней стенке, желудок – по большой кривизне, тонкий кишечник – вблизи места прикрепления к брыжейке, толстую кишку – по одной из продольных лент. Иссеченный отдел желудочно-кишечного тракта, после соответствующей препаровки, кладут на тонкую дощечку, расправляют, несколько растягивают, укрепляют лигатурами или иглами и в таком виде помещают в фиксирующую среду. Достаточно выдержать препарат в фиксаторе 6–12 часов.

Печень. Для этого органа чаще всего используют поперечный разрез через обе доли от выпуклой поверхности их и до ворот органа

на нижней поверхности; разрез не должен быть рассекающим. Помимо такого основного разреза, требуются дополнительные надрезы и вколы в малозаметных местах и тем многочисленнее и глубже, чем крупнее орган. В том случае, когда размеры препарата очень велики или имеют место какие-нибудь другие ограничения, пользуются отдельными ломтями и пластинами. Толщина пластин 3–4 см и более.

Если важно сохранить внешний вид органа и желательно избежать разрезов, то применяют или выскабливание глубоко расположенных и плохо фиксирующихся участков ткани, или впрыскивание фиксатора в толщу органа.

Во избежание сильного закрашивания фиксирующих жидкостей желчный пузырь, как правило, удаляют.

Поджелудочная железа. Обычно ограничиваются одним разрезом (не рассекающим) по всей длине органа. Фиксация органа проводится в течение 1–2 суток, в зависимости от толщины и плотности препарата.

Селезенка. Орган разрезают вдоль, по средней линии, от выпуклой поверхности и до ворот его; разрез не должен быть рассекающим. Когда размеры органа невелики и толщина его не превышает 2,5 см, то, для обеспечения хорошей фиксации, достаточно одного такого разреза. Кроме параллельных продольных разрезов, делают и другие – в малозаметных местах. Наконец, при больших размерах селезенки и достаточной ее плотности, можно вырезать отдельные пластины по длиннику органа, толщиной до 3–4 см и более.

Не рекомендуется делать разрезы на свежем органе в случае его большой дряблости. Такой орган лучше вначале уплотнить, помещая в какой-нибудь слабый фиксатор.

Сроки фиксации препаратов селезенки весьма различны и зависят от размеров органа, плотности ткани и разрезов.

Почки. Разрезают во фронтальной плоскости от выпуклой поверхности и по направлению к воротам органа. Части должны держаться только на лоханке. Препарат фиксируют в развернутом виде.

Сроки фиксации составляют 3–5 дней.

Мочевой пузырь. Вскрывают по передней стенке (от шейки и до дна), вскрытую полость заполняют сухой ватой.

У самцов мочевой пузырь для изготовления влажных препаратов следует брать вместе с предстательной железой.

Для фиксации собственно пузыря (без предстательной железы) достаточно 1-го дня.

Матка. Пользуются теми же разрезами, что и при патолого-анатомическом вскрытии. Вскрытую полость матки заполняют сухой ватой.

Если в ткани органа имеются опухолевые новообразования, их рассекают в желательном направлении, учитывая выгоды демонстрации.

Матка для изготовления влажных препаратов берется по возможности вместе с придатками.

Яичники. На органе делают разрезы, впрыскивают фиксирующую жидкость в толщу новообразования или, наконец, вырезают пластины.

Отдельные кисты можно заполнять сухой ватой, а на стенке накладывать швы.

Щитовидная железа. При изготовлении влажных препаратов делают продольные разрезы долей, лучше фронтальные.

Сроки фиксации определяют величиной препарата, разрезами и плотностью ткани.

Восстановление естественной окраски органов и тканей

Восстановление естественной окраски препарата происходит в спирте вследствие перехода метгемоглобина в нейтральный гематин (катгемоглобин), весьма сходный по цвету с оксигемоглобином:

1) после того как препарат хорошо профилировался в солевом растворе формалина, его промывают в проточной водопроводной воде (от 5–10 мин и до 1–2 часов, в зависимости от размеров консервируемого органа) (рис. 29, 30);



Рисунок 29 – Промывание тканей органа в проточной воде после фиксации в фиксирующей смеси (легкие собаки в состоянии острой застойной гиперемии)



Рисунок 30 – Промывание тканей органа в проточной воде после фиксации в фиксирующей смеси (легкие собаки в состоянии острой застойной гиперемии)

2) далее переносят в банку с крепким (90–96°) спиртом для восстановления естественной окраски. Восстановление цвета наступает доста-

точно быстро, в первые часы, для таких объектов, как слизистая оболочка, кишки, требуется 1–2 часа, а для крупных – 3–6 часов (рис. 31, 32);

3) как только орган принял свою естественную окраску, обработку спиртом прекращают.

Не следует держать препарат в спирте более 12–18 ч, потому что в этом случае происходит его обесцвечивание, вследствие извлечения из тканей нейтрального гематина.

Важно пользоваться крепким (90–96°) спиртом. Из денатурированных спиртов с хорошим эффектом может быть использован только формалиновый спирт.

При достаточном количестве спирта восстановление желательно проводить в двух его порциях (рис. 33).



Рисунок 31 – Цвет тканей органа после фиксации в фиксирующей смеси (легкие собаки в состоянии острой застойной гиперемии)



Рисунок 32 – Орган после фиксации, подготовленный для восстановления цвета в этиловом спирте (легкие собаки в состоянии острой застойной гиперемии)



Рисунок 33 – Восстановление цвета консервируемого органа в этиловом спирте (легкие собаки в состоянии острой застойной гиперемии)

Окончательное хранение влажных препаратов

Готовый препарат хранят в глицериновой смеси. Восстановленные в спирте препараты помещают для дальнейшего хранения в одну из глицериновых смесей, где они могут сохраняться долгое время (рис. 34).

Объекты, обработанные методом Йореса, Шульца и Кернера, переносят в глицериновую смесь только после основательной промывки в воде.

Виды и рецептура глицериновых смесей для хранения влажных препаратов

Для хранения влажных препаратов применяют следующие глицериновые смеси для хранения:

1. Н.Ф. Мельникова-Разведенкова:

- вода – 1000 мл;
- уксуснокислый калий (или натрий) – 400 г;
- глицерин – 600 мл.

2. Кайзерлинга:

- вода – 1000 мл;
- уксуснокислый калий – 200–800 г;
- глицерин – 200–350 мл.

В данной жидкости уксусно-кислый калий является консервантом, глицерин препятствует высыханию. Данный состав прост в изготовлении, дешев, но имеет склонность к заплесневению, поэтому требует особой тщательности при обработке и дезинфекции камер для хранения и самого влажного препарата.

3. Г.В. Шора (рис. 35):

- поваренная соль – 100 г;
- кипяток (крутой) – 1000 мл;
- растворяют, фильтруют и добавляют:
- спирт 96° – 150 мл;
- глицерин – 1000 мл.

В данной жидкости спирт и поваренная соль, обладая фунгицидным и антисептическим действием, являются консервантами. Глицерин в большом количестве, одновременно препятствует высыханию, так же является консервантом. Раствор № 2, более дорого-

стоящий и сложен в изготовлении, но характеризуется отсутствием побочных явлений в виде заплесневения и помутнения влажных препаратов.

4. Иореса:

- глицерин – 500 мл;
- вода 50 мл.



Рисунок 34 – Орган после восстановления цвета в этиловом спирте, подготовленный для окончательного хранения (легкие собаки в состоянии острой застойной гиперемии)



Рисунок 35 – Ингредиенты для изготовления глицериновой смеси для хранения влажных препаратов (по Г.В. Шору)

Все глицериновые смеси для хранения, как и жидкость Г.В. Шора, нужно готовить на горячей (кипяченой) водопроводной воде.

В случае смеси Кайзерлинга воду остужают до температуры 50–60 °С, после чего в ней растворяют уксуснокислый калий, при изготовлении смеси по Шору используют крутой кипяток, в котором растворяют поваренную соль. После растворения кристаллических веществ обе смеси фильтруют (рис. 36–39).

Жидкости с небольшим содержанием глицерина, например, смеси Н.Ф. Мельникова-Разведенникова и особенно Кайзерлинга, более склонны к заплесневению, в связи с чем, при их приготовлении рекомендуется не только соблюдать большую чистоту, но и добавлять в них немного камфары или тимола. Наибольшей стойкостью в отношении плесени обладает жидкость Г.В. Шора, в которую обычно ничего не добавляют.



Рисунок 36 – Изготовление глицериновой смеси для хранения влажных препаратов (использование кипяченой воды)



Рисунок 37 – Изготовление глицериновой смеси для хранения влажных препаратов (использование кипяченой воды)



Рисунок 38 – Изготовление глицериновой смеси для хранения влажных препаратов: процеживание раствора через чистую хлопчатобумажную ткань



Рисунок 39 – Изготовление глицериновой смеси для хранения влажных препаратов: введение этилового спирта в водно-глицериново-солевой раствор (по Г.В. Шору)

Препарат, поступивший в глицериновую смесь, для полного пропитывания должен быть выдержан в ней долго. Для тонкостенных образований достаточно бывает 1–2 недель, а для всех остальных ор-

ганов – не менее 3–5 недель, в зависимости от толщины и плотности объекта (рис. 40).

Глицериновая смесь по мере загрязнения должна заменяться свежей. Пропитывание в глицериновой смеси следует проводить в темноте, для чего посуду покрывают клеенкой. После того как объект пробыл в глицериновой жидкости достаточное время и хорошо пропитался, он подлежит окончательной заделке, которая может быть различной:

1) заключение в банку со свежей порцией глицериновой смеси – влажный способ;

2) хранение в герметически закупоренной посуде в сухом виде – способ Г.В. Шора;

2) заключение в плотную среду (желатину или агар-агар) – пластинчатый метод В.Т. Талалаева.



Рисунок 40 – Препарат после восстановления цвета в этиловом спирте, помещенный в глицериновую смесь для полного пропитывания

Из всех способов заделки наилучшим и наиболее распространенным является влажный, когда препарат заключают в банку со свежей порцией глицериновой смеси.

Помещаемый в банку объект укрепляют на стеклянной пластинке при помощи толстых шелковых или синтетических нитей, проведенных через ткани препарата длинной иглой в незаметных местах.

Стеклянные пластины должны одним своим ребром упираться в дно, а другим – в крышку банки. Если необходимо укрепить на препарате какие-либо камни (желчные или мочевые), то их приклеивают 20–25 %-м раствором желатины, которую затем подвергают дублению 15–20 %-м раствором формалина (рис. 41–46).



Рисунок 41 – Подготовка стеклянной пластины, для закрепления влажного препарата в емкости с глицериновой смесью: обработка этиловым спиртом



Рисунок 42 – Закрепление влажного препарата на стеклянной пластине с помощью шелковых нитей



Рисунок 43 – Закрепление влажного препарата на стеклянной пластине с помощью шелковых нитей: осуществление проколов тканей длинной иглой в непросматриваемых участках



Рисунок 44 – Закрепление влажного препарата на стеклянной пластине с помощью шелковых нитей



Рисунок 45 – Закрепление влажного препарата на стеклянной пластине, с помощью шелковых нитей



Рисунок 46 – Закрепление влажного препарата на стеклянной пластине с помощью шелковых нитей

Для хранения препаратов используют специальную патолого-анатомическую посуду. Для этих целей применяют банки различной формы (круглые и прямоугольные). Крышка у круглых банок может быть простой или притертой. Прямоугольные банки имеют всегда простую крышку. С практической точки зрения наиболее удобны круглые банки с притертой крышкой. Для их герметизации достаточно смазать шлейф вазелином и плотно закрыть банку. Банки же с простой крышкой в этом отношении не совсем удобны: для их герметизации необходимо использовать клей или замазку (рис. 47, 48).

Классическим методом герметизации крышек на банках с анатомическими препаратами считается менделеевская замазка. Однако обращение с ней трудно, требует сначала ее приготовления, а затем – разогревания перед каждым применением. Поэтому целесообразнее применять синтетические полимерные клеи и смеси: клей «Момент», эпоксидную смолу или строительный герметик. Перечисленные полимеры обеспечивают прочную фиксацию крышки и не припускают пары воды, т. е. препятствуют испарению консервирующей жидкости из банки и высыханию препарата.

Перед герметизацией края банки и крышку тщательно протирают, а затем обезжиривают тампонами, смоченными в спирт-эфире (рис. 49). После чего на край банки наносят слой клея, после подсыхания которого накладывают крышку. Крышку придавливают тяжелым предметом, чтобы она плотно и равномерно прилегла к краям банки. Груз снимают через 48–72 часа (рис. 50).

Музейные препараты, приготовленные с сохранением естественной окраски, должны храниться в темноте или без доступа солнечного света (во избежание выцветания) в прохладном сухом помещении (рис. 51, 52).



Рисунок 47 – Заключение подготовленного влажного препарата в емкость со свежей порцией глицериновой смеси для окончательного хранения



Рисунок 48 – Заключение подготовленного влажного препарата в емкость со свежей порцией глицериновой смеси для окончательного хранения: использование хлопчатобумажной ткани в качестве фильтра



Рисунок 49 – Обработка краев емкости для окончательного хранения влажного препарата перед прикреплением стеклянной крышки этиловым спирт-эфиром



Рисунок 50 – Прикрепление стеклянной крышки на емкость для окончательного хранения влажного препарата



Рисунок 51 – Правильное прикрепление бирки на емкость с влажным препаратом (бирка не мешает визуализации препарата)



Рисунок 52 – Неправильное прикрепление бирки на емкость с влажным препаратом (бирка мешает визуализации препарата)

3.2. Техника реставрации влажных музейных препаратов

При хранении влажных музейных препаратов в них самих и в средах для хранения могут возникнуть следующие дефекты:

1. *Глицериновая смесь потемнела, дала осадок, сам препарат без существенных изменений* – это наиболее часто встречающаяся ситуация; причины могут быть следующие (рис. 53, 54):

– препарат залит в некачественную глицериновую смесь для хранения;

– влажный препарат был плохо подготовлен к окончательной экспозиции, и в нем осталось большое количество экстрагируемых веществ (метгемоглобин, другие пигменты, жир и т. д.).

Реставрация. В подобной ситуации предпринимают следующие действия: емкость с препаратом вскрывают, глицериновую смесь удаляют, препарат извлекают и промывают в проточной воде, емкость отмывают сначала с поверхностно-активными веществами (ПАВ), затем с пищевой содой, влажный препарат возвращают в емкость и заливают свежеприготовленной глицериновой смесью для постоянного хранения (рис. 55, 56).



Рисунок 53 – Влажный препарат перед реставрацией: глицериновая смесь потемнела, дала осадок, сам препарат без существенных изменений



Рисунок 54 – Влажный препарат перед реставрацией: глицериновая смесь потемнела и окрасилась



Рисунок 55 – Промывание реставрируемого препарата в проточной воде



Рисунок 56 – Препарат после реставрации: помещение в емкость со свежей порцией глицериновой смеси для окончательного хранения

2. Глицериновая смесь потемнела, дала осадок, влажный препарат покрыт осадком, который не удаляется при мытье (рис. 57).

Реставрация. В подобных случаях поступают следующим образом: после извлечения и неэффективных попыток отмыть влажный препарат, его погружают в 10 %-й водный раствор пищевой соды на 30 минут при следующих температурных режимах:

- 50 °С для хрупких и нежных препаратов (головной мозг, глаз, препараты вегетативной нервной системы и т. д.);
- 90 °С для плотных препаратов (мышцы, связки, матка и т. д.);
- 70–80 °С для препаратов с промежуточной плотностью (кишечник, печень, почки).

При этой процедуре происходит частичное растворение и размягчение осадка, что позволяет удалить его механическим путем при помощи марли или ватных тампонов (рис. 58). После удаления осадка препарат помещается в свежую глицериновую смесь для хранения.



Рисунок 57 – Влажный препарат перед реставрацией: глицериновая смесь потемнела, дала осадок, влажный препарат покрыт осадком, который не удаляется при мытье



Рисунок 58 – Препарат после погружения в 10 %-й водный раствор пищевой соды: протирание марлевым тампоном с этиловым спиртом

3. Появление в глицериновой смеси и на самом препарате плесени. Подобная ситуация может наблюдаться при недостаточной обработке стеклянных камер для хранения, погрешностей в приготовлении глицериновых сред для хранения препаратов, нарушений технологии изготовления самих препаратов, а также при хранении влажных препаратов в глицериновых средах Н.Ф. Мельникова-Разведенкова и особенно, Кайзерлинга, склонных к заплесневению.

Реставрация. В подобных случаях поступают следующим образом: плесень удаляют механическим путем, влажный препарат извлекают, промывают в проточной воде, помещают в водный 10 %-й раствор пищевой соды при 50 °С на 1 час, после чего удаляют остатки

размякшей плесени (рис. 59, 60). Далее препарат заворачивают в слой марли, смоченной насыщенным спиртовым раствором тимола на 1 час. После этого препарат погружают в свежую жидкость для окончательной экспозиции.

4. Появление отложений жировоска на поверхности препарата и в смесях для хранения. Жировоск – это продукт гидролиза и омыления жиров жировой клетчатки. Он имеет белый цвет, вязкую консистенцию и запах прогоркшего масла.

Реставрация. Для удаления жировоска применяют ряд следующих процедур:

- 1) механические методы;
- 2) растворение жировоска в различных химических растворителях: эфир, спирт-эфир, ацетон.

После механического удаления жировоска его остатки удаляют растворителями, нанесенными на марлю. В случае малой эффективности этих мер используют нагревание препарата в 10 %-м водном растворе пищевой соды при 60–70 °С в течение часа. После остатки жировоска повторно удаляют механическим путем и при помощи растворителей.



Рисунок 59 – Появление отложений жировоска на поверхности препарата и в смеси для хранения



Рисунок 60 – Проведение реставрации влажных музейных препаратов

5. Окончательное хранение препаратов.

В качестве жидкости для сохранения влажных музейных препаратов используются глицериновые смеси.

Контрольные вопросы

1. Каковы правила и основные этапы изготовления влажных препаратов?

2. Какие рецептуры используют для приготовления фиксирующих смесей при изготовлении влажных препаратов?

3. Назовите основные правила подготовки органов и тканей перед консервацией.

4. Каким образом и на основании чего следует проводить выбор оптимального состава фиксирующей смеси?

3. Каким образом проводят приготовление глицериновых смесей для хранения влажных препаратов?

4. В каких случаях прибегают к реставрации влажных препаратов? Каким образом ее осуществляют?

ТЕМА 4. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. История развития гистологических методов исследования

В своем развитии гистология прошла три периода:

1. *Домикроскопический период* – начался более 2000 лет назад, когда великие ученые и врачи древности Аристотель, Гален, Авиценна, Везалий и другие без микроскопа пытались понять строение органов и тканей организма животных и человека.

2. *Микроскопический период* – начался около 400 лет назад, после изобретения первых микроскопов:

– 1595 г. – *отец и сын Янсены (Hans Jansen and Zacharias Jansen)* – изобрели первый микроскоп, который был исключительно прост и представлял две металлические трубки, вставленные в третью с обеих сторон последней таким образом, чтобы первые две могли сдвигаться и раздвигаться, и две линзы: двояковыпуклая в объективе и плоско-выпуклая в окуляре. Эта конструкция позволяла достичь трехкратного увеличения с полностью сдвинутыми трубками и девятикратного – с полностью раздвинутыми (рис. 61, 62). Некоторые исследователи утверждают, что первый микроскоп был сконструирован *Корнелиусом Дреббелем*, изобретателем первой подводной лодки.

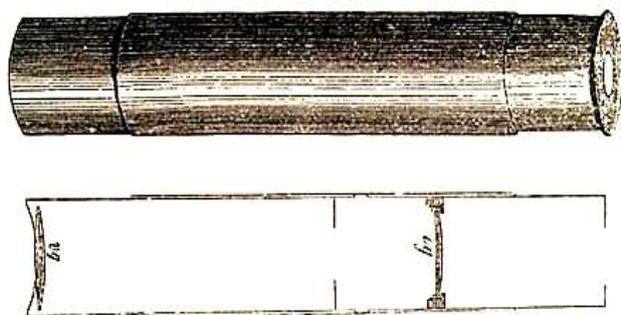


Рисунок 61 – Схема устройства микроскопа, разработанная отцом и сыном Янсенами



Рисунок 62 – Микроскоп, разработанный отцом и сыном Янсенами

– 1600 г. – Галилео Галилей внес некоторое усовершенствование в оптическую конструкцию микроскопа Корнелиуса Дреббеля, заменив выпуклую линзу в окуляре вогнутой, которая разворачивала перевернутое выпуклой линзой изображение. Тогда же микроскоп стал называться микроскопом с легкой руки друга Галилея и члена академии Деи Линчеи (рис. 63, 64).



Рисунок 63 – Микроскоп, разработанный Галилео Галилеем (в собранном состоянии)



Рисунок 64 – Устройство микроскопа, разработанного Галилео Галилеем

Подобным микроскопом, принимая во внимание простоту конструкции, можно было пользоваться как с подставкой, так и без нее, кроме того, использовать устройство, как подзорную трубу. Подобный трехногий дизайн, названный «итальянским», просуществовал не менее двухсот лет, фокусировка на исследуемых предметах достигалась либо за счет развинчивания или завинчивания тубуса, либо простого раздвигания тубуса (рис. 65, 66).



Рисунок 65 – Микроскоп «итальянского» типа, с развинчивающейся конструкцией



Рисунок 66 – Микроскоп «итальянского» типа, с раздвигающимся корпусом

– 1665 г. – английский физик Р. Гук разработал научный труд «Микрография» (англ. *Micrographia*), а также усовершенствовал микроскоп и впервые разглядел в некоторых растениях ячейки, назван-

ные им клетками. Гук использовал двояковыпуклую линзу в объективе и две дополнительных плосковыпуклых линзы, расположенные выпуклыми поверхностями друг к другу, одно размещенное в окуляре, а другое – в тубусе микроскопа. Линзы в тубусе и в окуляре были съемными, линза в тубусе микроскопа могла быть извлечена для того, чтобы уменьшив сильные сферические и хроматические aberrации изображения (такие искажения изображения, которые возникают в результате неравного преломления лучей света с разной длиной волны, разными участками линзы), рассмотреть мелкие детали. Линзы в тубусе и в окуляре Гук фиксировал и герметизировал воском, а между ними заливал чистую воду. Увеличение достигалось значительное кратностью – от 30 до 50 раз, лучшее возможное на тот момент. Для того чтобы преодолеть искажения изображения Гук попытался использовать диафрагму с крохотным отверстием, помещая ее на оптической оси, для того чтобы ограничить лучи от краевых отделов линзы, пытаясь таким образом увеличить резкость, но в таком случае, наблюдалась нехватка света, в связи с чем Гук нашел выход в виде сконструированной им системы искусственного освещения, которая располагалась на отдельной от микроскопа стойке и состояла из масляной лампы, свет от которой фокусировался на объекте исследования при помощи сосуда заполненного водой, и плосковыпуклой линзы (рис. 67, 68).



Рисунок 67 – Микроскоп, разработанный Р. Гуком



Рисунок 68 – Микроскоп и система искусственного освещения, разработанные Р. Гуком

Итальянский естествоиспытатель М. Мальпиги (1628–1694) описал строение кожи, селезенки, почки и других органов.

Голландский исследователь Антони Ван Левенгук (1632–1783) разработал микроскоп, увеличительная способности которого превосходила все существовавшие тогда устройства подобного рода. Микроскоп представлял собой две плоские тонкие металлические (обычно латунные) пластинки прикрученные друг к другу. Между пластинками располагалась двояковыпуклая линза, обладающая в зависимости от качества линзы значительным увеличением – от семидесяти до 275 раз минимальными аберрациями – результат непревзойденный до изобретения в 1830 г. ахроматических линз. Линзы, изготовленные Левенгуком из капелек стекла были невероятного по тем временам качества, имели толщину около миллиметра, а радиус кривизны составлял 0,75 мм.

Микроскоп Левенгука был простым в обращении: препарат помещался на иглу, положение которой корректировалось посредством двух винтов, длинным винтом препарат выводился в поле зрения, передвигаясь вверх и вниз в вертикальной плоскости, а при помощи короткого – наводился фокус, кроме того, имелась ручка, посредством которой корректировалось положение препарата в горизонтальной плоскости (рис. 69). Изучаемый препарат насаживался на острие длинного винта, в том случае если изучению подвергалась жидкость, то жидкость заливалась в цилиндрический сосуд, фиксированный специальным держателем к длинному винту. Подобное устройство позволяло достигнуть значительного увеличения, но с уменьшением размера линз, прямо пропорционально уменьшается фокусное расстояние, поэтому располагать как микроскоп так и образец, нужно было в непосредственной близости от глаза, а исследование проводить в условиях очень хорошей освещенности (рис. 70). Благодаря своему изобретению А. Левенгук впервые описал красные кровяные тельца и их движение в капиллярах, сперматозоиды, поперечную исчерченность скелетной также впервые были обнаружены живые существа в капле дождевой воды (простейшие).

Чешский ученый Я. Пуркинье впервые обнаружил и описал ядро в яйцеклетке, а затем в различных клетках тканей животных, ганглиозные нейроны коры мозжечка, проводящие волокна сердца (1825–1827).

Завершением этого периода были работы Шлейдена и Шванна. (1838), которые обобщили накопленные наукой факты и создали кле-

точную теорию, являющуюся величайшим открытием в биологии. Клеточная теория легла в основу изучения не только нормального строения тканей, но и патологических изменений тканей и органов («клеточная патология» Р. Вирхова, 1856).



Рисунок 69 – Микроскоп, разработанный А. Левенгуком



Рисунок 70 – Процесс проведения микроскопического исследования с помощью микроскопа, разработанного А. Левенгуком

Основные положения клеточной теории:

- клетка – наименьшая единица живого;
- клетки разных организмов сходны по своему строению;
- размножение клеток происходит путем деления исходной клетки («всякая клетка от клетки»);
- многоклеточные организмы представляют собой сложные ансамбли клеток, объединенные в системы тканей и органов.

С увеличением разрешающей способности микроскопов появилась возможность изучения мелких деталей клеток и тканей. Это потребовало изготовления более тонких, пропускающих достаточное количество света препаратов, для чего использовали различные приемы раздавливания, мацерации, расщепления тканей. Затем стали изготавливать срезы тканей, сначала от руки опасной бритвой и лишь с 70-х гг. XVIII в. с помощью специальных приспособлений – микро-томов.

Только в XIX в. были разработаны основные приемы изготовления постоянных гистологических препаратов (пригодных для много-

кратного использования в течение длительного времени): фиксация, пропитывание тканей в средах, позволяющих изготавливать тонкие срезы на микротоме, окраска и заключение срезов в различные среды.

Новый этап развития науки связан с именами К. Вольфа и К. Бэра – основоположников эмбриологии. В первой половине XIX в. чешский физиолог и гистолог Я. Пуркинье применил с помощью специальных методов заливки уплотнение исследуемых тканей, ввел в гистологическую технику бальзам, просветление тканей в скипидаре и оливковом масле, окраску препаратов индиго и другими красителями.

В XIX веке гистология была полноправной академической дисциплиной. В середине XIX века А. Келликер, Лейдинг и др. создали основы современного учения о тканях. Р. Вирхов положил начало развитию клеточной и тканевой патологии. Открытия в цитологии и создание клеточной теории стимулировали развитие гистологии. Большое влияние на развитие науки оказали труды И. И. Мечникова и Л. Пастера, сформулировавших основные представления об иммунной системе.

В 1842 г. Ганновер (A. Hannover) предложил в качестве фиксатора хромовую кислоту, в 1844 г. Майер (C. Mayer) сделал попытки микрофотографирования.

В 1851 г. для окраски гистологических срезов был применен кармин, в 1860 г. – серебрение тканей (Ф. Реклингхаузен).

С появлением первых теоретических работ о механизмах фиксации и окраски (Витт (O. Witt), 1890; П. Эрлих, 1891) гистологических объектов техника гистологических исследований стала быстро развиваться.

Нобелевскую премию 1906 года в физиологии присудили двум гистологам, Джорджо и Сантьяго Рамон-и-Кахалю. Они имели взаимно-противоположные воззрения на нервную структуру головного мозга различных рассмотрений одинаковых снимков.

В развитии гистологической техники важная роль принадлежит отечественным исследователям. В 1782 г. А. М. Шумлянский применил очень тонкие методы инъекции красящих растворов для изучения кровеносных сосудов и мочевых канальцев почек. А.И. Бабухин внес ряд усовершенствований в конструкцию микроскопа и микротомы.

К.А. Арнштейн, А.С. Догель, О.Е. Смирнов усовершенствовали метод окраски нервных элементов метиленовым синим (метод Догеля).

Отечественная гистология развивалась в тесной связи с развитием мировой науки. На первых порах это были разделы и курсы в программе смежных дисциплин – анатомии, патологической анатомии, сравнительной анатомии и физиологии 30–40 года XIX века.

Позднее гистологию стали преподавать на самостоятельных кафедрах гистологии. Они были учреждены почти одновременно в Московском, Петербургском и Казанском университетах в 60-х годах XIX века. Несколько позднее появились кафедры гистологии в Киевском и Харьковском университетах. Очень скоро эти кафедры стали центрами крупных гистологических исследований и школами подготовки научных кадров.

3. *Современный период развития* начался с середины XX века, когда были созданы первые электронные микроскопы, стала развиваться цитохимия, иммуногистохимия, молекулярная биология.

В XX веке продолжалось совершенствование методологии, что привело к формированию гистологии в ее нынешнем виде. Достижения патологической гистологии широко используются в медицине, позволяя понять механизм развития болезней и предложить способы их лечения.

4.2. Гистологические методы исследования клеток и тканей

4.2.1. Методы микроскопического исследования

Гистология и цитология располагают разнообразным арсеналом как классических, так и современных методов, направленных на изучение строения и функций клеток, тканей и органов.

Цитологические и гистологические методы исследования получают все большее распространение и в клинической диагностике различных заболеваний.

Гистологические методы исследования (греч. *histos* – столб, ткань + *logos* – учение) – методы, применяемые для изучения строения и функций клеток и тканей растительных и животных организмов в норме, патологии и в эксперименте.

Более узким по сравнению с гистологическими методами исследования является термин «*гистологическая техника*», которым обозначают комплекс методических приемов, используемых в гистологии, а также в нормальной и патологической анатомии, главным образом при изготовлении препаратов клеток и тканей для их последующего микроскопирования.

Гистологические методы исследования постоянно совершенствуются, появляются новые методы, основанные на использовании достижений оптики, физики, химии, молекулярной биологии и др. Широко используют методы гистохимии, электронная микроскопия позволяет исследовать более мелкие структуры клеток. Совершенствуются также методы непосредственного наблюдения живых клеток и тканей, их культивирования, микрохирургические приемы. Постоянно развиваются и методы объективной регистрации микроскопических наблюдений: микрофотография, цейтраферная микрокиносъемка.

Основным методом исследования в гистологии и цитологии является микроскопирование.

I. Микроскопирование:

а) *световая микроскопия* – исследования обычным световым микроскопом;

б) *специальные методы микроскопирования:*

– фазово-контрастная микроскопия – изучение живых неокрашенных объектов;

– темнопольная микроскопия – изучение живых неокрашенных объектов;

– люминесцентная микроскопия – изучение живых неокрашенных объектов;

– ультрафиолетовая микроскопия – повышает разрешающую способность микроскопа;

– поляризационная микроскопия – для исследования объектов с упорядоченным расположением молекул (скелетная мускулатура, коллагеновые волокна и т. д.);

в) *электронная микроскопия:*

– трансмиссионная – изучение объектов на просвет;

– сканирующая – изучение поверхности объектов (рис. 71).



Рисунок 71 – Методы микроскопии

II. Специальные (немикроскопические) методы исследования гистологических препаратов – для изучения фиксированных клеток и тканей или их компонентов: гисторентгенографию (микрорентгенографию), рентгеноструктурный анализ, автогисторадиографию и другие методы.

1. *Цито- или гистохимия* – суть заключается в использовании строго специфических химических реакций со светлым конечным продуктом в клетках и тканях для определения количества различных веществ (белков, ферментов, жиров, углеводов и т. д.). Можно применить на уровне светового или электронного микроскопа.

2. *Цитофотометрия* – метод применяется в комплексе с цито- или гистохимией и дает возможность количественно оценить выявленные цитогистохимическим методом белки, ферменты и т. д.

3. *Авторадиография* – метод регистрации радиоактивного распада в тканевых и клеточных структурах фотографическим способом, широко используют в исследованиях клеточного метаболизма, а также как прием изотопной маркировки клеток при изучении их дифференцировки, возможных трансформаций и т. д.

Для исследования в организм вводят вещества, содержащие радиоактивные изотопы химических элементов, которые включаются в обменные процессы в клетках. Локализацию, дальнейшие перемещения этих веществ в органах определяют на гистопрепаратах по излучению, которое улавливается фотоэмульсией, нанесенной на препарат.

4. *Рентгеноструктурный анализ* (метод дифракции рентгеновских лучей) широко применяют в исследовании органических кристаллов, с помощью этого метода изучена молекулярная структура коллагена, гемоглобина, ДНК, миоглобина. Метод позволяет определить количество химических элементов в клетках, изучить молекулярную структуру биологических микрообъектов.

5. *Морфометрия* – измерение размеров биологических структур на клеточном и субклеточном уровне.

6. *Микроургия* – проведение очень тонких операций микроманипулятором под микроскопом (пересадка ядер, введение в клетки различных веществ, измерение биопотенциалов и т. д.)

6. *Метод культивирования клеток и тканей* – в питательных средах или в диффузионных камерах, имплантированных в различные ткани организма.

7. *Ультрацентрифугирование* – фракционирование клеток или субклеточных структур путем центрифугирования в растворах различной плотности.

8. *Гисторентгенография* основана на исследовании поглощения рентгеновских лучей структурами микрообъектов; например, возможно получение количественных данных о содержании кальция в различных участках кости и т. п.

9. *Экспериментальный метод.*

10. *Метод трансплантации тканей и органов.*

Оптическая микроскопия

Для гистологических исследований наиболее часто используют световой микроскоп. Кроме обычного светового микроскопа, в гистологии используют микроскопы специального назначения:

- *фазово-контрастные;*
- *интерференционные;*
- *микроскопы с конденсором темного поля;*
- *люминесцентные или флуоресцентные;*
- *поляризационные.*

Световая микроскопия

Световая микроскопия обеспечивает увеличение в 2–3 тысяч раз, цветное и подвижное изображение живого объекта, возможность микрокиносъемки и длительного наблюдения одного и того же объекта, оценку его динамики и химизма.

Характеристика светового микроскопа

Основными характеристиками любого микроскопа являются разрешающая способность и контраст.

Разрешающая способность – это минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом раздельно. Разрешение человеческого глаза в режиме наилучшего видения равно 0,2 мм.

Контраст изображения – это различие яркостей изображения и фона. Если это различие составляет менее 3–4 %, то его невозможно уловить ни глазом, ни фотопластинкой; тогда изображение останется невидимым, даже если микроскоп разрешает его детали.

На контраст влияют как свойства объекта, которые изменяют световой поток по сравнению с фоном, так и способности оптики уловить возникающие различия в свойствах луча.

Возможности светового микроскопа ограничены волновой природой света. Физические свойства света – цвет (длина волны), яркость (амплитуда волны), фаза, плотность и направление распространения волны изменяются в зависимости от свойств объекта. Эти различия и используются в современных микроскопах для создания контраста.

Увеличение микроскопа – определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. У типичных исследовательских микроскопов увеличение окуляра равно 10 (8), а увеличение объективов – 4, 10, 40 и 100. Соответственно, увеличение такого микроскопа составляет от 40 до 1000. Некоторые из микроскопов имеют увеличение до 2000. Еще более высокое увеличение не имеет смысла, так как при этом разрешающая способность не улучшается. Напротив, качество изображения ухудшается.

Числовая апертура используется для выражения разрешающей способности оптической системы или светосилы объектива.

Светосила объектива – интенсивность света, приходящаяся на единицу площади изображения, приблизительно равна квадрату NA .

Величина NA – составляет примерно 0,95 для хорошего объектива. Микроскоп обычно рассчитывают таким образом, чтобы его полное увеличение составляло около 1000 NA . Если между объективом и образцом ввести жидкость (масло или, что бывает реже, дистиллированную воду), то получится «иммерсионный» объектив с величиной NA , достигающей 1,4 и с соответствующим улучшением разрешения.

Современные световые микроскопы – это сложные оптические приборы, их подразделяют на студенческие, рабочие, лабораторные и исследовательские, различающиеся по конструкции и комплектации оптикой. Отечественные микроскопы («Биолам», «Бимам», «Микмед») имеют обозначения, указывающие, к какой группе они относятся (С – студенческие, Р – рабочие, Л – лабораторные, И – исследовательские), комплектация обозначается цифрой (рис. 72).

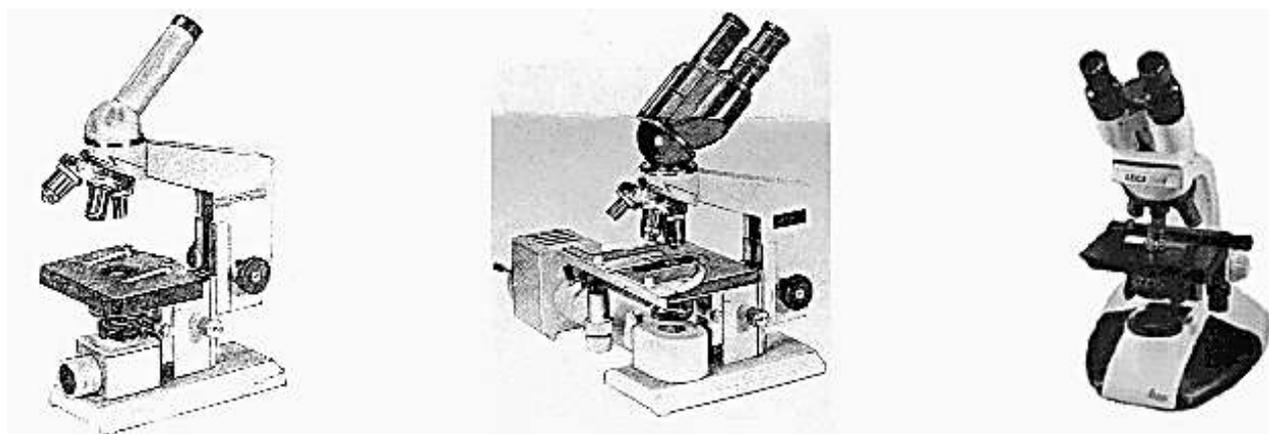


Рисунок 72 – Виды микроскопов: студенческий, рабочий, лабораторный (слева направо)

Уход за микроскопом

При работе с микроскопом нельзя применять большие усилия. Нельзя касаться пальцами поверхности линз, зеркал и светофильтров.

Чтобы предохранить внутренние поверхности объективов, а также призмы тубуса от попадания пыли, необходимо всегда оставлять окуляр в тубусе. При чистке внешних поверхностей линз нужно удалить с них пыль мягкой кисточкой, промытой в эфире. Если необходимо, осторожно протирают поверхности линз хорошо выстиранной, не содержащей остатков мыла, полотняной или батистовой тряпочкой, слегка смоченной чистым бензином, эфиром или специальной смесью для чистки оптики. Не рекомендуется протирать оптику объективов ксилолом, так как это может привести к их расклеиванию.

С зеркал, имеющих наружное серебрение, можно только удалять пыль, сдувая ее резиновой грушей. Протирать их нельзя. Нельзя также самостоятельно развинчивать и разбирать объективы – это приведет к их порче. По окончании работы с микроскопом необходимо тщательно удалить остатки иммерсионного масла с фронтальной линзы объектива указанным выше способом. Затем опустить предметный

столик (или конденсор в микроскопах с неподвижным столиком) и накрыть микроскоп чехлом.

Для сохранения внешнего вида микроскопа необходимо периодически протирать его мягкой тряпкой, слегка пропитанной бескислотным вазелином и затем сухой мягкой чистой тряпкой.

Устройство светового микроскопа

В микроскопе различают механическую и оптическую части (рис. 73).

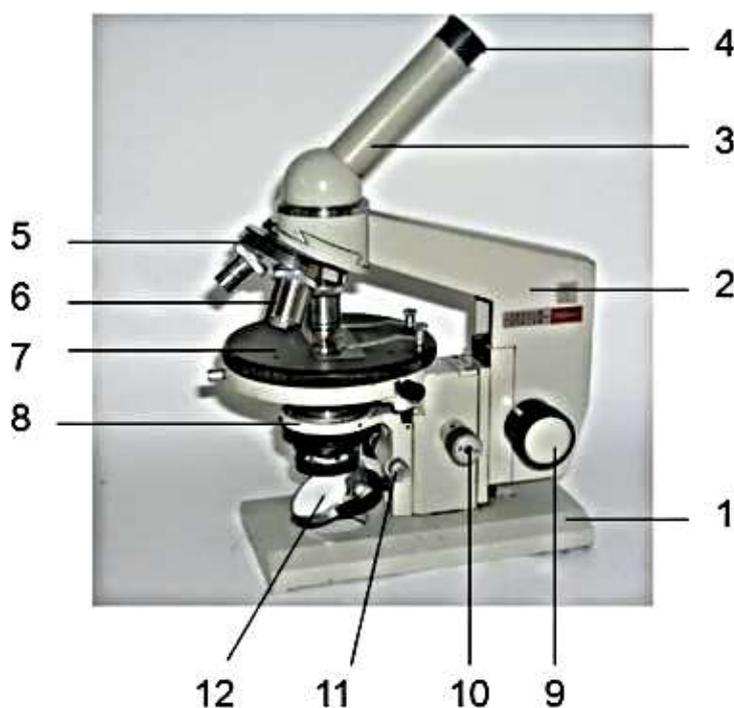


Рисунок 73 – Устройство светового микроскопа: 1 – основание микроскопа; 2 – тубусодержатель; 3 – тубус; 4 – окуляр (чаще $\times 7$); 5 – револьвер микроскопа; 6 – объективы (а – сухие: $\times 8$, $\times 20$, $\times 40$; б – иммерсионный $\times 90$); 7 – предметный столик; 8 – конденсор; 9 – макрометрический винт; 10 – микрометрический винт; 11 – винт конденсора; 12 – зеркало

К механической части относят:

- штатив – состоит из основания и тубусодержателя;
- укрепленные на штативе тубус с револьвером для крепления и смены объективов;
- предметный столик для препарата;
- приспособления для крепления конденсора и светофильтров;

- встроенные в штатив *механизмы для грубого* (макромеханизм, макровинт) и *тонкого* (микромеханизм, микровинт) *перемещения предметного столика или тубусодержателя.*

Оптическая часть микроскопа представлена:

- *объективами;*
- *окулярами;*
- *осветительной системой,* состоящей из расположенных под предметным столиком конденсора Аббе;
- *зеркалом,* которое имеет плоскую и вогнутую сторону;
- *отдельного или встроенного осветителя.*

Объективы ввинчивают в револьвер, а соответствующий окуляр, через который наблюдают изображение, устанавливают с противоположной стороны тубуса.

Различают следующие виды световых микроскопов:

- *монокулярный* – имеющий один окуляр;
- *бинокулярный* – имеющий два одинаковых окуляра.

Методы оптической микроскопии

Методы световой микроскопии – освещение и наблюдение. Методы микроскопии выбирают (и обеспечивают конструктивно) в зависимости от характера и свойств изучаемых объектов, так как последние, как отмечалось выше, влияют на контрастность изображения.

1. Метод светлого поля и его разновидности

Метод светлого поля – в проходящем свете применяется при изучении прозрачных препаратов с включенными в них абсорбирующими (поглощающими свет) частицами и деталями. Это могут быть, например, тонкие окрашенные срезы животных и растительных тканей, тонкие шлифы минералов и т. д.

В отсутствие препарата пучок света из конденсора, проходя через объектив, дает вблизи фокальной плоскости окуляра равномерно освещенное поле. При наличии в препарате абсорбирующего элемента происходит частичное поглощение и частичное рассеивание падающего на него света, что и обуславливает появление изображения. Возможно применение метода и при наблюдении неабсорбирующих объектов, но лишь в том случае, если они рассеивают освещающий пучок настолько сильно, что значительная часть его не попадает в объектив (рис. 74).

Метод косо́го освещения – разновидность предыдущего метода. Отличие между ними состоит в том, что свет на объект направляют под большим углом к направлению наблюдения. Иногда это помогает выявить «рельефность» объекта за счет образования теней.

Метод светлого поля в отраженном свете применяют при исследовании непрозрачных отражающих свет объектов, например шлифов металлов или руд. Освещение препарата (от осветителя и полупрозрачного зеркала) производят сверху, через объектив, который одновременно играет и роль конденсора. В изображении, создаваемом в плоскости объективом совместно с тубусной линзой, структура препарата видна из-за различия в отражающей способности ее элементов; на светлом поле выделяются также неоднородности, рассеивающие падающий на них свет.

2. Метод темного поля и его разновидности

Микроскопия в темном поле (темнопольная микроскопия) – основана на явлении рассеивания света на границе двух объектов с разными показателями преломления (например, ядро и цитоплазма).

Темнопольный микроскоп отличается от обычного только специальным конденсором, приспособленным для бокового освещения объекта. Таким образом, прямой свет в объектив не попадает, а объект, освещенный рассеянным светом, кажется светлым на темном фоне.

Так, в живой клетке ядрышко, ядерная мембрана, митохондрии, жировые капли и другие включения будут светиться на темном фоне неструктурированной цитоплазмы. Метод находит применение в экспериментальной микробиологии, лабораторной диагностике, в частности для обнаружения бледных трепонем в гуманной медицине, лептоспир и др.

Метод темного поля в проходящем свете (Dark-field microscopy) используют для получения изображений прозрачных неабсорбирующих объектов, которые не могут быть видны, если применить метод светлого поля. Свет от осветителя и зеркала направляется на препарат конденсором специальной конструкции – конденсором темного поля. По выходе из конденсора основная часть лучей света, не изменившая своего направления при прохождении через прозрачный препарат, образует пучок в виде полого конуса и не попадает в объектив (который находится внутри этого конуса). Изображение в микроскопе формируется при помощи лишь небольшой части лучей, рассеянных микрочастицами находящегося на предметном стекле препарата внутрь конуса и прошедшими через объектив (рис. 75).

Темнопольная микроскопия основана на эффекте Тиндалля (*Tyndall effect*), известным примером которого служит обнаружение

пылинок в воздухе при освещении их узким лучом солнечного света. В поле зрения на темном фоне видны светлые изображения элементов структуры препарата, отличающихся от окружающей среды показателем преломления. У крупных частиц видны только светлые края, рассеивающие лучи света. Используя этот метод, нельзя определить по виду изображения, прозрачны частицы или непрозрачны, больший или меньший показатель преломления они имеют по сравнению с окружающей средой.

Ультрамикроскопия – в основе метода ультрамикроскопии лежит тот же принцип – препараты в ультрамикроскопах освещаются перпендикулярно направлению наблюдения. При этом методе можно обнаружить (но не «наблюдать» в буквальном смысле слова) чрезвычайно мелкие частицы, размеры которых лежат далеко за пределами разрешающей способности наиболее сильных микроскопов. При помощи иммерсионных ультрамикроскопов удастся зарегистрировать присутствие в препарате частиц размером до 2×10^{-9} м. Но форму и точные размеры таких частиц с помощью этого метода определить невозможно. Их изображения представляются наблюдателю в виде дифракционных пятен, размеры которых зависят не от размеров и формы самих частиц, а от апертуры объектива и увеличения микроскопа. Так как подобные частицы рассеивают очень мало света, то для их освещения требуются чрезвычайно сильные источники света, например угольная электрическая дуга. Ультрамикроскопы применяют в основном в коллоидной химии.

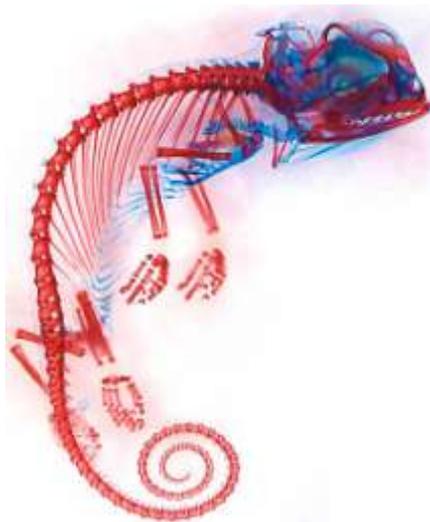


Рисунок 74 – Эмбрион хамелеона йеменского (*Chamaeleo calyptratus*): хрящи (голубой) и кости (красный).
Светлопольная микроскопия



Рисунок 75 – Личинка кольчатого червя. Темнопольная микроскопия.
100-кратное увеличение

3. *Фазово-контрастная микроскопия и интерференционная микроскопия* основаны на свойстве биологических структур, прозрачных для видимого света, изменять фазу проходящих через них лучей. Поскольку в разных участках объекта, отличающихся показателем преломления и толщиной, эти изменения неодинаковы, биологические структуры становятся видимыми. Предназначены для получения изображений прозрачных и бесцветных объектов, невидимых при наблюдении по методу светлого поля. К таковым относят, например, живые неокрашенные животные ткани.

Суть метода в том, что даже при очень малых различиях в показателях преломления разных элементов препарата световая волна, проходящая через них, претерпевает разные изменения по фазе (приобретает так называемый фазовый рельеф). Не воспринимаемые непосредственно ни глазом, ни фотопластинкой, эти фазовые изменения с помощью специального оптического устройства преобразуются в изменения амплитуды световой волны, т. е. в изменения яркости («амплитудный рельеф»), которые уже различимы глазом или фиксируются на фоточувствительном слое. Иными словами, в получаемом видимом изображении распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным. Благодаря применению этого способа микроскопии контраст живых неокрашенных микроорганизмов резко увеличивается и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст) (рис. 76, 77).



*Рисунок 76 – Диатомеи:
фазово-контрастная микроскопия*



*Рисунок 77– Инфузория туфелька:
дифференциальная интерференционная
контрастная микроскопия*

Фазово-контрастную и интерференционную микроскопию живых клеток и тканей, особенно физиологических процессов клеток культуры тканей, часто сочетают с замедленной (цейтраферной) или с ускоренной микро-киносъемкой, с помощью которой можно не только зафиксировать эти процессы, но и представить их в динамике. Фазово-контрастная микроскопия применяется также для изучения клеток культуры ткани, наблюдения действия различных вирусов на клетки и т. п. В этих случаях часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики – инвертированные микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор – сверху (рис. 78).

Интерференционную микроскопию используют также для получения количественных данных о сухой массе, показателях преломления объектов и их толщине. Разновидностью фазово-контрастного микроскопирования является *аноптральная микроскопия*.

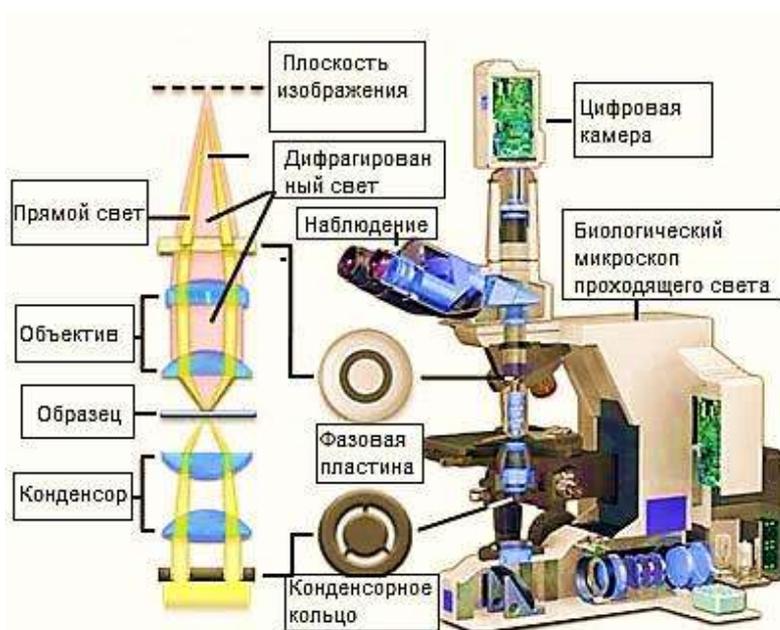


Рисунок 78 – Конфигурация фазово-контрастного микроскопа

4. *Поляризационная микроскопия* основана на свойстве анизотропии (двойного лучепреломления) структур в клетках и тканях и применяется главным образом для выявления и идентификации некоторых кристаллических веществ и липидов, а также поперечнополосатых мышц, коллагена, миелина и т. д. (рис. 79).

Поляризационная микроскопия – метод наблюдения в поляризованном свете для микроскопического исследования препаратов, включающих оптически анизотропные элементы (или целиком состоящих из таких элементов). Таковыми являются многие минералы, зерна в шлифах сплавов, некоторые животные и растительные ткани и пр.

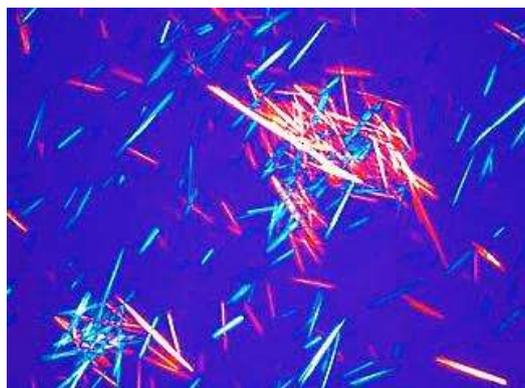


Рисунок 79 – Кристаллы урата натрия: поляризационная микроскопия

Оптические свойства анизотропных микрообъектов различны в различных направлениях и проявляются по-разному в зависимости от ориентации этих объектов относительно направления наблюдения и плоскости поляризации света, падающего на них. Наблюдение можно проводить как в проходящем, так и в отраженном свете. Свет, излучаемый осветителем, пропускают через поляризатор. Сообщенная ему при этом поляризация меняется при последующем прохождении света через препарат (или отражении от него). Эти изменения изучают с помощью анализатора и различных оптических компенсаторов. Анализируя такие изменения, можно судить об основных оптических характеристиках анизотропных микрообъектов: силе двойного лучепреломления, количестве оптических осей и их ориентации, вращении плоскости поляризации, дихроизме (рис. 80).

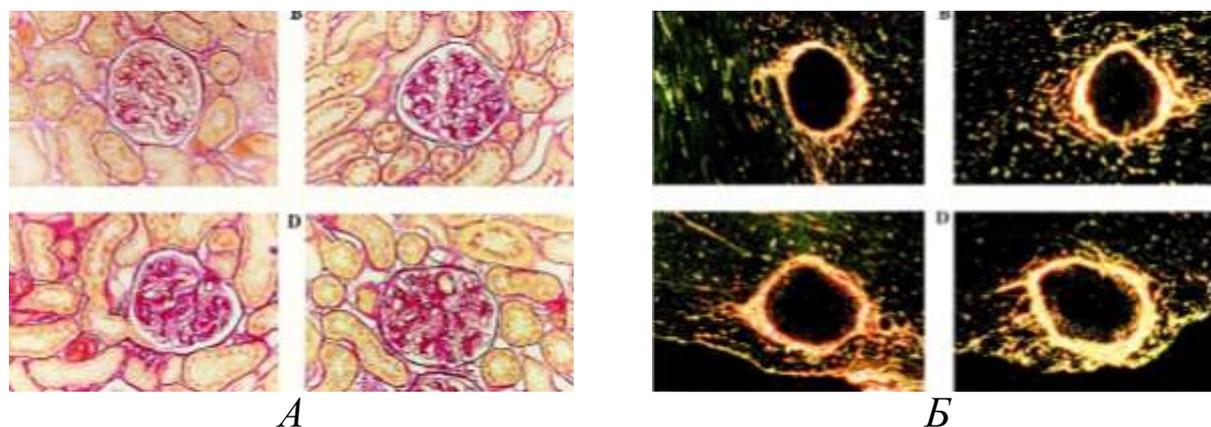


Рисунок 80 – Применение поляризационной микроскопии для селективного выявления коллагена I и III типа: в первой серии снимков (А) препараты окрашенные Пикросириусом красным исследованы при помощи стандартной светопольной световой микроскопии – коллагеновые волокна ярко-красного цвета, на бледно-желтом фоне, а клеточные ядра – серые или коричневые. Во второй серии снимков (Б) препараты окрашенные Пикросириусом красным исследованы при помощи поляризационной микроскопии – демонстрирующей двойное лучепреломление коллагеновых волокон: более толстые коллагеновые волокна приобретают ярко желтый или оранжевый цвет, а более тонкие и ретикулиновые волокна – зеленый

5. *Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия (метод исследования в свете люминесценции)* основана на регистрации флюоресцирующих веществ, дает возможность наблюдать клетки и ткани при освещении (возбуждении) ультрафиолетовыми или синевфиолетовыми лучами.

Люминесцентный микроскоп со стеклянной оптикой позволяет наблюдать флюоресценцию в видимой части спектра, ультрафиолетовый флюоресцентный микроскоп с кварцевой оптикой используют для изучения невидимой ультрафиолетовой флюоресценции путем ее фотографической или фотоэлектрической регистрации. С помощью люминесцентных микроскопов можно наблюдать собственную флюоресценцию содержащихся в тканях веществ, например, витаминов А, В₂, некоторых пигментов.

В ультрафиолетовой области флюоресцируют, например, содержащие триптофан белки. Наибольшее распространение, однако, получило использование специальных флюоресцентных красителей (флюорохромов). Флюорохромы применяют в небольших концентрациях (1:10000–1:100000), что позволяет широко использовать их для прижизненных наблюдений клеток и тканей. Интенсивность и спектры флюоресценции могут быть измерены (*микрофлюорометрия*), т. е. может быть получена и количественная, и качественная характеристика флюоресцирующих в клетке веществ.

Флюоресцентные микроскопические методы широко используют не только для прижизненных наблюдений; они нашли применение в гистохимии, в иммуноморфологии (метод флюоресцирующих антител Кунса). Наблюдение при освещении сверху иногда называют «люминесцентной микроскопией в отраженном свете» (этот термин условен – возбуждение свечения препарата не является простым отражением света). Его часто используют совместно с наблюдением по фазово-контрастному методу в проходящем свете. Большие возможности для прижизненных наблюдений дает метод контактной флюоресцентной микроскопии (Брумберг Е. М., 1964), позволяющий получать изображения с поверхности органов и тканей. При этом используют специальные объективы, выполняющие одновременно роль опак-иллюминатора и конденсора (рис. 81).

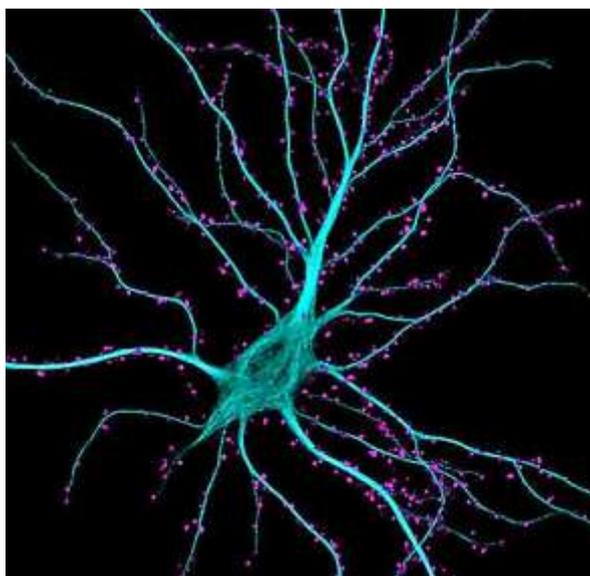


Рисунок 81 – Гиппокампальный нейрон во время приема возбуждающего сигнала: флуоресценция и конфокальная микроскопия

6. *Ультрафиолетовая микроскопия* основана на абсорбции ультрафиолетовых лучей химическими структурами клеток (белки, нуклеиновые кислоты). Этот метод применим для прижизненных наблюдений, однако наибольшее распространение он нашел в количественной цито- и гистохимии – *метод абсорбционной цитоспектрофотометрии*.

Метод наблюдения в ультрафиолетовых (УФ) лучах позволяет увеличить предельную разрешающую способность микроскопа, т. е. понизить его предельное разрешение, которое зависит от длины волны (λ) применяемого излучения (для используемых в микроскопии УФ лучей $\lambda = 400\text{--}250$ нм, тогда как для видимого света $\lambda = 700\text{--}400$ нм). Но главным образом этот метод расширяет возможности микроскопических исследований за счет того, что частицы многих веществ, прозрачные в видимом свете, сильно поглощают УФ излучение определенных длин волн и, следовательно, легко различимы в УФ изображениях. Характерными спектрами поглощения в УФ области обладает, например, ряд веществ, содержащихся в растительных и животных клетках (пуриновые основания, пиримидиновые основания, большинство витаминов, ароматические аминокислоты, некоторые липиды, тироксин и др.); это обусловило широкое применение УФ микроскопии в качестве одного из методов цитохимического анализа.

Ультрафиолетовые лучи невидимы для человеческого глаза, поэтому изображения в УФ микроскопии регистрируют либо фотографически, либо с помощью электроннооптического преобразователя или люминесцирующего экрана. Распространен следующий способ цветового представления таких изображений: препарат фотографиру-

ется в трех длинах волн УФ области спектра; каждый из полученных негативов освещается видимым светом определенного цвета (например, синим, зеленым и красным), и все они одновременно проектируются на один экран. В результате на экране создается цветное изображение объекта в условных цветах, зависящих от поглощающей способности препарата в ультрафиолете (рис. 82, 83).

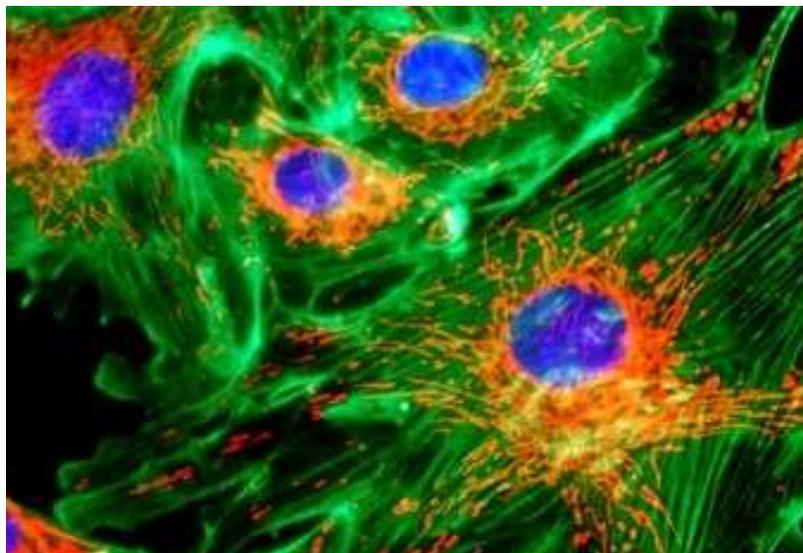


Рисунок 82 – Эпителиальные клетки легочной артерии быка (ультрафиолетовая микроскопия; тройное иммунофлуоресцентное окрашивание)

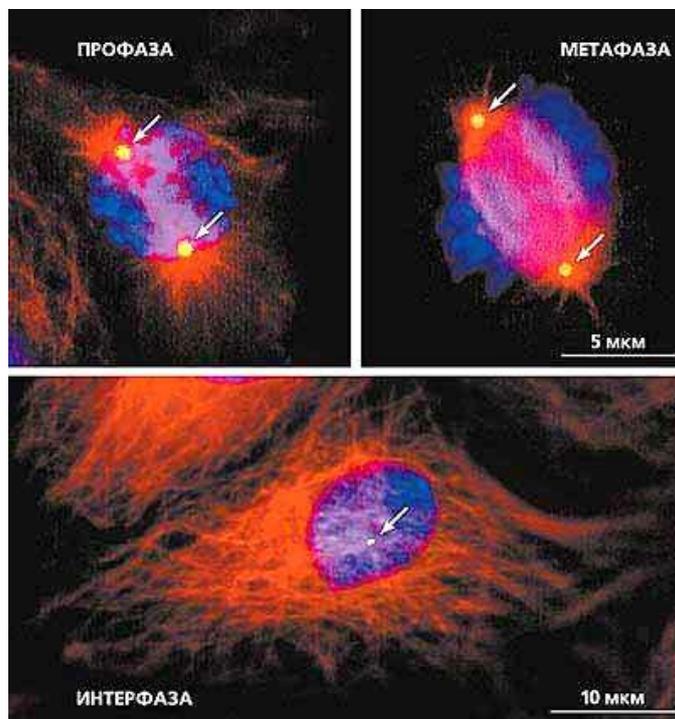


Рисунок 83 – Центросома и система микротрубочек в профазной, метафазной и интерфазной клетках: микротрубочки (красный цвет), центросомы (зеленый цвет), ДНК (синий цвет). Положение центросом показано стрелками (ультрафиолетовая микроскопия; тройное иммунофлуоресцентное окрашивание)

Методы электронной микроскопии

Метод, при котором вместо света используют поток электронов, стеклянные линзы заменены электромагнитными полями, максимальное увеличение 1,5 млн раз. Не требует окраски препарата.

В электронном микроскопе образец облучается не видимым светом, а пучком электронов. Длина же электронной волны значительно меньше, чем световой. Соответственно, такая волна «чувствует» меньшие препятствия: разрешающая способность микроскопа оказывается выше. Конструктивная особенность состоит в том, что в электронном микроскопе в качестве линз используют электромагнитные катушки (рис. 84).



Рисунок 84 – Электронный микроскоп

Применение электронной микроскопии в биологии позволило изучить сверхтонкую структуру клетки внеклеточных компонентов тканей. На основании результатов, полученных с помощью данного метода (максимальное увеличение до 800–1200 тыс.), начиная с 40-х гг. было описано тонкое строение мембран, митохондрий, рибосом и

других клеточных, а также внеклеточных структур, выявлены некоторые макромолекулы, например ДНК.

Растровая (сканирующая) электронная микроскопия (РЭМ) дает возможность изучать тонкое строение поверхности клеток и тканевых структур не только фиксированных объектов, но и живых животных. По своим возможностям РЭМ является продолжением оптической микроскопии, расширяющей ее возможности в исследовании топологии поверхностей кристаллических материалов. Разрешение наиболее распространенных РЭМ достигает 5–10 нм при недостижимой для других видов микроскопов глубине резкости 0,6–0,8 мм (рис. 85).



Рисунок 85 – Виды электронной микроскопии: трансмиссионная, сканирующая

Трансмиссионная (просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)) предполагает изучение тонких образцов с помощью пучка электронов, проходящих сквозь них и взаимодействующих с ними. Электроны, прошедшие сквозь образец, фокусируются на устройстве формирования изображения: флуоресцентном экране, фотопластинке или сенсоре ПЗС-камеры. Благодаря меньшей чем у света длине волны электронов ПЭМ позволяет изучать образцы с разрешением в десятки тысяч раз превосходящим разрешение самого совершенного светоптического микроскопа. С помощью ПЭМ возможно изучение объектов даже на атомарном уровне. На относительно малых увеличениях контраст на ПЭМ возникает из-за поглощения электронов материалом исследуемого образца. На высоких увеличениях сложное

взаимодействие волн формирует изображение, требующее более сложной интерпретации (рис. 86, 87).

Техника приготовления биологических препаратов для электронной микроскопии включает процедуры, сохраняющие ткань в условиях глубокого вакуума под пучком электронов и реализующие высокое разрешение. Для повышения контраста изображения клеток их обрабатывают «электронными красителями», сильно рассеивающими электроны.

Применение электронной микроскопии в биологии существенно изменило и углубило прежние представления о тонком строении клетки.



Рисунок 86 – Опухолевые клетки на поверхности брюшины: растровая электронная микроскопия

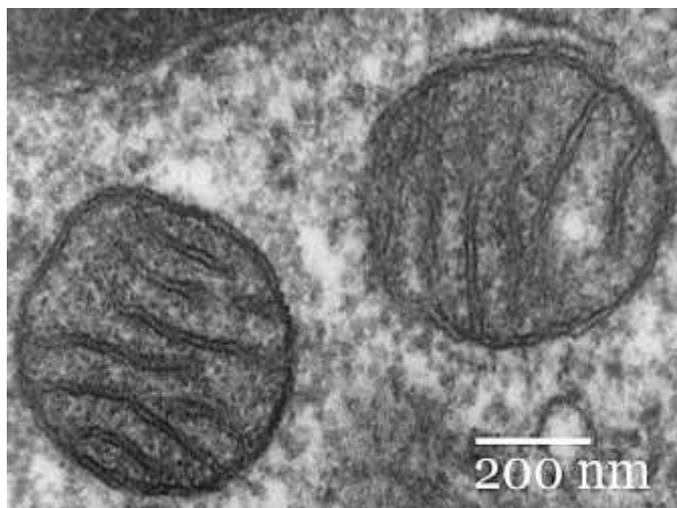


Рисунок 87 – Митохондрии: просвечивающая электронная микроскопия

Макромикроскопические методы исследования гистологических препаратов

В ряде гистологических исследований применяют макромикроскопические методы, предназначенные для изучения структур, находящихся на грани макроскопических и микроскопических величин. В таких исследованиях обычно используют бинокулярный (стереоскопический) микроскоп (лупу).

Примером макромикроскопических методов может служить *микротрахископия*, разработанная М. А. Бароном (1949). Данный метод позволяет изучать трехмерную топографию структур органов и тканей. При использовании соответствующих увеличений (объекти-

вов) удастся наблюдать и микроскопические структуры – ядра клеток и даже ядрышки.

Техника микротрахископии

Кусочки органов и тканей (обычно размером 1,5×1,5 см и толщиной не менее 3–4 мм) после фиксации и окраски разрезают параллельно поверхности на две части, так что препараты толщиной 1,5–2,0 мм оказываются окрашенными лишь с одной стороны.

Полученные пластинки наклеивают неокрашенной стороной на целлулоид и просветляют в растворах глицерина и уксуснокислого калия возрастающих концентраций.

Препарат заключают в прозрачную среду (глицерин, канадский бальзам и др.), помещают на вогнутое сферическое зеркало и рассматривают в бинокулярный микроскоп (лупу) при падающем и боковом (проходящем) свете.

4.2.2. Гистологическое исследование фиксированных объектов. Изготовление гистологических препаратов

Правила организации гистологической лаборатории

Организация рабочего места во многом определяет эффективность и качество работы лаборанта. Рациональная расстановка и размещение лабораторной посуды, инструментария, необходимых растворов и реактивов позволяют без суеты, с наименьшей затратой усилий выполнить за одно и то же время больший объем работы (рис. 88, 89).

Комната для подготовки материала

Прием и вырезку биопсийного материала осуществляют в комнате, расположенной рядом со служебным входом. В комнате устанавливают вытяжной шкаф, письменный стол (с бланками) для регистрации материала, в вытяжном шкафу – доски (размером 40 x 20 см), на которых проводится вырезка, небольшой шкаф для посуды и инструмента, раковина-мойка.

При возможности диктофонной записи у шкафа на уровне лица прозектора подвешивают микрофон. Если нет вытяжного шкафа, вырезку производят на столе. На столе устанавливают тиски, с помощью которых выпиливают кусочки кости.

Рабочая комната лаборантов

В рабочей комнате лаборанта должны быть вытяжной шкаф, химический и физический столы, шкаф и сейф для хранения химических реактивов. Перечень необходимого оборудования лаборатории включает технические и аналитические весы, рН-метр, микротомы

(санные, ротационные, замораживающие), криостат или криокит, водяную баню, столик для расплавления парафиновых срезов, комплекты автоматических пипеток, термостаты, холодильники, микроскопы, автоматы для проводки материала и др. В данном помещении производят необходимые анализы.

Рабочий стол. При отсутствии специальных столов для лаборанта с успехом может быть приспособлен любой стол (желательно с ящичками) с площадью рабочей поверхности не менее 60 x 120 см.

Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из какого-либо влагоустойчивого материала (настольное или толстое оконное стекло, линолеум, пластик или клеенка). Однако участок стола, предназначенный для непосредственной работы по приготовлению препаратов, в любом случае необходимо накрыть стеклом и расположить под ним небольшие (9×12 см) листы белой или черной бумаги. Этим создается соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными (белый лист) и неокрашенными (черный лист) объектами. Рекомендуются также на оба листа нанести контуры предметного стекла с обозначением места расположения и размеров покровного стекла. Этот простой прием позволяет рационально разместить на предметном стекле срезы в процессе их заключения.

Достаточная освещенность рабочего места является одним из важнейших условий, так как изготовление гистологических препаратов требует значительного напряжения зрения. Необходимо максимально использовать дневной свет. Лучше ставить рабочий стол около окна. Однако даже при достаточном свете рабочее место должно быть оснащено специальным осветителем к микроскопу или настольной лампой (с наклоняющейся верхней частью).

Моечная

Моечная – комната, предназначенная для мытья посуды. Она оборудована раковинами, ванной. В местах установки раковин и других сантехнических приборов следует предусматривать отделку стен глазурированной плиткой или другими влагостойкими материалами на высоту 1,6 м от пола и на ширину более 20 см оборудования и приборов с каждой стороны.

Помещение для размещения оборудования и хранения экспериментальных образцов

Архивная комната оборудуется стеллажами с полками, имеющими обозначения по годам, номерам и характеру материала («биопсийный», «аутопсийный», «музейный» и др.). В шкафах хранят парафиновые блоки, гистологические препараты, всю документацию патолого-анатомического отделения. Сырой материал и формалин

хранят в подвале. Гистологические препараты, подлежащие временному хранению, после истечения положенного срока, смывают, предметные стекла используются вторично. В архивной комнате могут быть установлены столы с компьютерами. Работа с архивным материалом разрешается только в помещении архива, без выноса материалов за его пределы.

Санитарные помещения

Необходимы для персонала и его комфортной работы. Сюда входят душевые, гардеробные, умывальные, помещение для отдыха персонала и т. д.



Рисунок 88 – Гистологическая лаборатория в частном госпитале Пенсильвания (Pennsylvania Hospital), 1890 г.



Рисунок 89 – Современная гистологическая лаборатория: работа лаборанта с гистологическим автоматом

Лабораторная посуда

В любой гистологической лаборатории применяют большой набор разнообразной лабораторной посуды. В настоящем разделе дается описание лишь самых необходимых образцов (рис. 90, 91).

Широкогорлые банки с притертыми пробками различной вместимости от 50 до 200 мл используют для составления гистологических батарей, предназначенных для подготовки кусочков тканей к заливке различными средами. Более крупные банки применяют для фиксации и хранения кусочков тканей в фиксирующих жидкостях, обработки предметных стекол, приготовления нейтрального формалина и пр. Перед помещением в банки легко испаряющихся жидкостей (спирт, эфир, ацетон и т. д.) необходимо тщательно проверить, хорошо ли притерты пробки. Для этого достаточно проделать пробу с

эфиром. Если пробка хорошо притерта, то налитый в банку эфир не определяется по запаху.

Бюксы – небольшие круглые стеклянные стаканчики различного диаметра и высоты с шлифованными крышками – наиболее распространенная посуда для обработки гистологических срезов и маленьких кусочков тканей.

Биологические стаканчики – круглые, овальные или четырехугольные (как и высокие бюксы) – применяют для проводки гистологических срезов, монтированных на предметных стеклах. Для придания стаканчикам большей устойчивости и обеспечения определенного порядка в расстановке их помещают в специальные стойки, изготовленные из дерева или пластмассы, по несколько штук в ряд в зависимости от методики обработки.

Кюветы – четырехугольные стеклянные чашки с крышками, имеющие на двух противоположных сторонах прорези, в которые вставляют предметные стекла. Применяют для одновременной окраски нескольких срезов, наклеенных на предметные стекла.

Чашки Петри – широкие, плоские стеклянные чашки с крышками – пригодны для различных манипуляций (окраска свободно плавающих и наклеенных на предметные стекла срезов, использование в качестве подставок под бюксы и т. д.).

Мерная посуда – цилиндры и мензурки различной емкости (от 10 до 250–500 мл), воронки разных размеров.

Химические стаканчики – круглые стеклянные стаканчики без крышек вместимостью 50–100 мл – находят широкое применение при проведении гистохимических реакций, окраски срезов, наклеенных на стекла и т. д.

Колбы (плоскодонные) – вместимостью от 50 мл до 2 л. Малые колбы применяют для приготовления и хранения растворов различных красителей, большие – под дистиллированную воду и прочие жидкости, расходуемые в больших количествах.

Кристаллизаторы – круглые глубокие чашки из толстого стекла (различной вместимости) – применяют для массовой промывки наклеенных на стекла срезов, сливания отработанных жидкостей и других надобностей.

Пипетки обычные (предназначенные для закапывания лекарств) – используют для накалывания на срезы красителей и различных жидкостей, градуированные (вместимостью 0,1–100 мл) применяют для

отмеривания малых количеств различных жидкостей при составлении растворов (особенно в гистохимической практике).

Часовые стекла (различного диаметра) – применяют для обработки свободно плавающих срезов, нуждающихся в контроле под микроскопом (серебрение нервной ткани и др.).

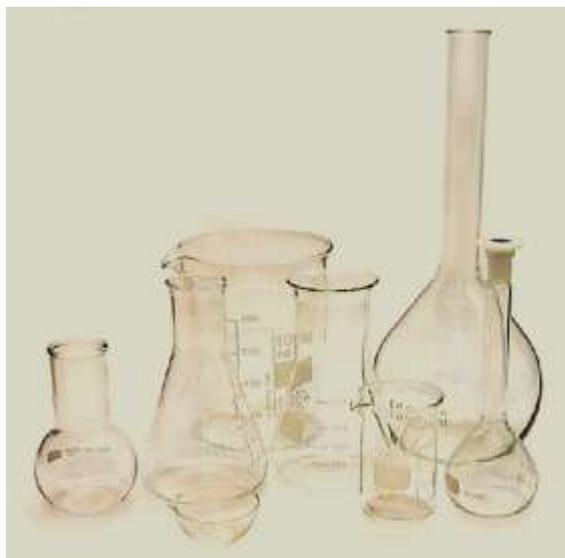


Рисунок 90 – Лабораторная посуда для гистологической лаборатории



Рисунок 91 – Контейнеры для гистологии с завинчивающейся крышкой

Расстановка и этикетировка лабораторной посуды

Правильная расстановка и этикетировка лабораторной посуды играют существенную роль, так как позволяют избежать лишних движений и путаницы в процессе обработки препаратов, стандартизируют рабочий процесс и в конечном итоге повышают производительность труда.

Прежде чем приступить к какому-либо этапу приготовления гистологических препаратов (обезвоживание, окраска и т. д.), следует отобрать необходимую чистую посуду, обозначить ее назначение и целесообразно расположить.

Особое внимание следует уделять своевременной этикетировке посуды. Несоблюдение этого правила может привести не только к помехам в процессе обработки материала, но и к более серьезным последствиям вплоть до несчастных случаев.

Посуду, употребляемую постоянно для одних и тех же целей, этикетируют с помощью бумажных наклеек (для этой цели можно

применять и лейкопластырь), на которые нанесены четкие обозначения содержимого. Надпись следует делать черной тушью, но, чтобы она не расплывалась при попадании раствора, необходимо этикетку покрыть пленкой из 1–2 % целлоидина или коллодия.

Посуду, подлежащую разовому употреблению, помечают специальным карандашом для письма по стеклу.

Помимо лабораторной посуды, для приготовления микропрепаратов необходимы *предметные и покровные стекла*.

Предметные стекла – прямоугольные пластины размером 76×26 мм и толщиной 1–2 мм, предназначенные для размещения гистологических срезов в процессе приготовления постоянных препаратов.

Покровные стекла – представляют собой тонкие (0,15–0,2 мм толщины) пластинки различных размеров. Служат для покрытия обработанных срезов, расположенных на предметном стекле.

Чистота посуды является одним из важнейших условий в гистологической технике (рис. 92). Поэтому всю посуду, идущую в употребление, предварительно тщательно моют в теплой мыльной воде специальными щетками, затем в холодной проточной воде и в заключение ополаскивают дистиллированной. В тех случаях, когда посуда должна быть особенно чистой (приготовление растворов, проведение гистохимических реакций), ее помещают в смесь следующего состава:

- *бихромат калия $K_2Cr_2O_7$ (насыщенный раствор)* – 100 мл;
- *вода горячая* – 1000 мл;
- *серная кислота (концентрированный раствор)* – 100 мл.

Для приготовления этой смеси сначала растворяют в горячей воде бихромат калия, затем раствор охлаждают и только после этого добавляют серную кислоту тонкой струйкой. В этом составе предметные стекла (и любую другую посуду) выдерживают 2–3 дня, а затем промывают в проточной воде в течение 1–2 дней.

Приготовление раствора требует соблюдения техники безопасности: работа в резиновых перчатках и обязательно в вытяжном шкафу. При этом особое внимание следует обратить на то, чтобы добавлять не водный раствор к серной кислоте, что может привести к разбрызгиванию кислоты и ожогам, а кислоту к водному раствору.

Хранить раствор с помещенными в него стеклами также рекомендуется в вытяжном шкафу.

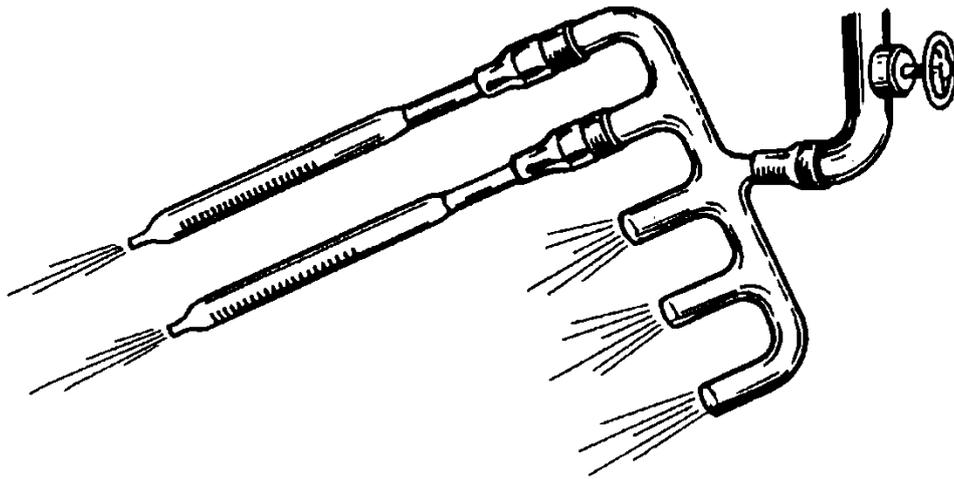


Рисунок 92 – Приспособление для промывания пипеток

Вымытую лабораторную посуду не вытирают, а помещают для сушки в сушильный шкаф, так как при вытирании на ней могут остаться волокна от ткани.

Предметные стекла подсушивают на воздухе (или в сушильном шкафу), закладывают в широкогорлую стеклянную банку и, залив смесью из равных частей спирта и эфира (или бензола), плотно закрывают. Такая обработка не только очищает стекла от грязи, но и обезжиривает их поверхность, что очень важно для хорошего приклеивания срезов.

Перед употреблением стекло достают пинцетом и вытирают чистой (желательно льняной) тряпкой, следя при этом, чтобы на поверхности не оставались волокна от материи и пылинки. Держать стекло нужно за края, чтобы не оставлять на поверхности следов пальцев.

Подобным же образом подготавливают покровные стекла, помещая их после промывания в бюксы со спирт-эфиром. Протирка покровных стекол из-за их тонкости требует большой осторожности и соответствующих навыков.

Для промывания пипеток целесообразно иметь специальное приспособление, изображенное на рисунке. Главную трубку с помощью переходного резинового шланга надевают на водопроводный кран, а на отводные трубки, также снабженные резиновыми муфточками, – пипетки. Открыв кран, их промывают под напором, после чего опускают на несколько часов в цилиндр, заполненный раствором бихромата калия (на дно цилиндра обязательно нужно положить стеклянную вату, чтобы предупредить откалывание носиков у пипе-

ток). После этого пипетки вновь тщательно промывают в проточной воде, ополаскивают дистиллированной водой и помещают в сушильный шкаф.

Следует принять за правило – не оставлять использованную посуду длительное время без промывания. Если нет возможности ее тут же окончательно вымыть, то необходимо ополоснуть и залить водой. Для удаления засохших реактивов требуется значительно больше усилий, а иногда их вовсе невозможно отмыть.

Инструменты

В повседневной работе лаборанту необходимо иметь набор инструментов: ножницы с прямыми браншами, средние и малые (глазные); пинцеты разных размеров и образцов: анатомические (концы браншей плоские с насечками), хирургические (концы с выступами), специальные (с тонкими изогнутыми концами); скальпели средние и малые (глазные), препаровальные иглы тонкие прямые или изогнутые с ручкой (применяются для накалывания объектов при фиксации, расправления свернувшихся срезов, переноса их из одной чашечки в другую и т. д.); стеклянные крючки для вылавливания и переноса срезов; кровоостанавливающие зажимы для пережимания сосудов и захвата тканей при вскрытии животных; корнцанг – зажим с длинными ручками – для извлечения предметных стекол из банок со спирт-эфиром, а также для захвата мелких лабораторных животных; шпатели – металлические или пластмассовые прямые и изогнутые лопаточки для переноса срезов и кусочков тканей, взятия различных сыпучих веществ; шприцы различной вместимости для инъекций красителей при прижизненной окраске тканей и других процедур.

За инструментом необходим тщательный уход. После применения его следует сразу же мыть (если нужно, очищать) и насухо вытирать (или высушивать в сушильном шкафу).

Лаборанту необходимо также иметь спиртовку, небольшую мягкую волосяную кисточку (для снятия срезов с микротомного ножа), иголку, нитки и плотную бумагу для этикетировки материала, карандаши для письма по стеклу, фильтровальную и индикаторную (для определения рН раствора) бумагу. Для вырезания кусочков из органов необходимы также лезвия безопасной бритвы и доска, пластиковая или деревянная, размером 40×25 см.

Лаборант должен иметь несколько тетрадей для записей. Основная тетрадь служит для записей освоенных и осваиваемых методик обработки материала, так как, несмотря на наличие методических ру-

ководств, у каждого лаборанта в процессе работы появляются свои наблюдения, вызывающие порой дополнения или некоторые видоизменения отдельных этапов обработки.

У лаборантов должна быть тетрадь для занесения информации о каждом виде исследуемого материала. Далее приведена одна из форм подобной тетради (табл. 1).

Таблица 1 – Форма протокольной тетради

| Но-мер п/п | Дата поступления материала | Вид животного | Характер патологии | Дневник наблюдения | Дата фиксации | Материал | Фиксатор |
|------------|----------------------------|---------------|-------------------------|--|---------------|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 | 20.05.2018 г | Кошка | Опухоль молочной железы | Послеоперационное течение без осложнений | 20.05.2018 г. | Молочная железа, лимфатические узлы | Формалин, Карнуа, Буэна |

Архив гистологических препаратов

Для хранения препаратов в архиве удобно использовать малярный скотч, который не оставляет следов на стекле, легко отклеивается и приклеивается обратно, на нем также можно писать номер исследования и маркеры, если это препараты после иммуногистохимического исследования. После упаковки гистологических препаратов с помощью малярного скотча их укладывают в картонные коробки или ящики для хранения в архиве (рис. 93).



Рисунок 93 – Упаковка гистологических препаратов с помощью малярного скотча для хранения в архиве

Аппараты для гистологических исследований

Гистологическое оборудование

Для четкой организации процесса гистологического исследования является важным качественный подбор необходимого оборудования. В каждой отдельной лаборатории имеется набор средств для автоматической обработки образцов. В зависимости от объемов и особенностей выполняемых задач перечень приборов может варьироваться.

В целях подготовки материала для гистологических работ и исследования препаратов применяют следующие аппараты:

- *микроскопы;*
- *микротомы;*
- *автоматизированные аппараты для гистологической обработки тканей и окраски препаратов;*
- *аппараты для лиофильной сушки препаратов;*
- *микроманипуляторы;*
- *термостаты;*
- *нагревательные столики;*
- *устройства для автоматизации анализа морфологических структур.*

Микротомы

Микротом – предназначен для производства тонких срезов, пригодных для микроскопических исследований; он состоит из основания, приводного механизма, механизма микроподачи, объектодержателя, ножедержателя с ножом.

Получение среза осуществляется при движении ножа или объекта в одном направлении, а при обратном движении срабатывает механизм подъема объекта на заданную величину, обеспечивая необходимую толщину среза в последующем цикле.

Используемые микротомы можно отнести к двум типам:

1. *Микротомы, в которых объект укреплен неподвижно в держателе, а нож, производящий срезы, подвижен* – существуют конструкции, в которых нож движется по горизонтальным или наклонным направляющим – санные и радиальные микротомы (рис. 94).

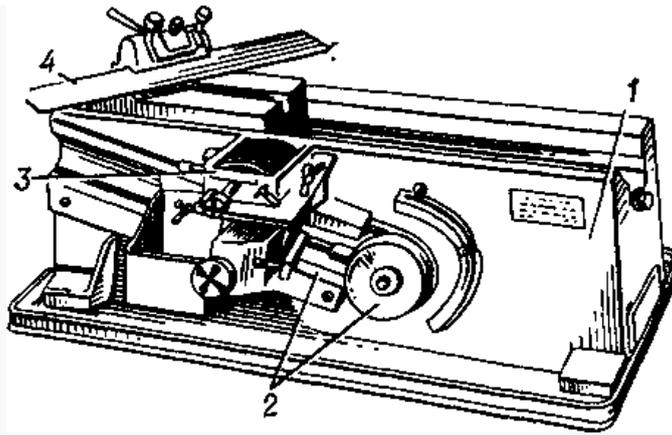


Рисунок 94 – Саный микротом: 1 – станина микротомы; 2 – устройство, поднимающее объект на заданную высоту; 3 – объектдержатель; 4 – нож, закрепленный в «салазках», скользящих по направляющим станины

2. Микротомы, в которых объект при помощи специального механизма движется по вертикали или горизонтали и надвигается на лезвие укрепленного неподвижного ножа, с каждым срезом смещаясь в сторону на заданную величину – *ротационные микротомы* (рис. 95, 96).



Рисунок 95 – Ротационный микротом



Рисунок 96 – Работа лаборанта на ротационном микротоме

Для приготовления срезов с объектов, залитых в парафин, целлоидин, используют радиальный, ротационный или саный микротомы.

Саные микротомы характеризуются горизонтальным движением ножа и вертикальным подъемом блокодержателя. Их с успехом используют для резки объектов, залитых в целлоидин, целлоидин-парафин и парафин. Основные части микротомы располагаются на специальных салазках, отсюда происходит его название. Принцип работы санного микротомы заключается в том, что при обратном ходе

ножа ножевые салазки толкают стержень со шкалой регулятора подачи, вызывая его перемещение. Движение стержня передается на тягу, которая с помощью «собачки» поворачивает храповик. Вращение храповика передается микровинту, который с помощью разъемной гайки перемещает салазки с блоком вверх. С каждым срезом блок поднимается все выше на расстояние, соответствующее толщине среза. После того как блокодержатель достигнет высшей точки, с помощью разъемной гайки надо опустить салазки с механизмом в крайнее нижнее положение. Существуют другие разновидности санных микротомов с различными вариантами способов подачи, зажимов для ножей и т. д.

Ротационные микротомы предназначены для резки парафиновых блоков, с их помощью можно получать серийные срезы. Важнейшая часть ротационного микротома – механизм микроподачи, который включает в себя храповик, дифференциальный механизм, микровинт, лимб, косозубую передачу и кулачок. Приводной механизм при повороте вала с помощью «собачки» поворачивает на заданное количество зубьев храповик, на оси которого находится зубчатое колесо, передающее через шестерню вращение микровинту. Винт перемещает каретку подачи объектодержателя. Толщина срезов устанавливается поворотом лимба (рис. 97, 98). Объектодержатель ротационного микротома – винтовой зажим, вмонтированный в шаровую оправу каретки подачи. Шарнирный механизм позволяет подать блок под любым углом. Объектодержатель фиксируется в зажиме специальной рукояткой (рис. 99, 100).



Рисунок 97 – Принцип работы ротационного микротома



Рисунок 98 – Работа лаборанта на ротационном микротоме

Держатель для ножа – массивная подставка с двумя вертикальными стойками, в которые вмонтированыдвигающиеся держатели, приспособленные для установки ножа под нужным углом. Фиксация ножа осуществляется винтами. В переднезаднем направлении нож перемещается по специальным направляющим с помощью винта. Постепенно приближая нож к объекту и одновременно поворачивая колесо подачи, подравнивают площадь резания, а затем нож фиксируют.

Ротационные микротомы снабжены специальной транспортной лентой, на которую с ножа попадает полоска (серия) срезов. На ленте их разделяют препаровальными иглами и производят дальнейшие манипуляции. Снимать срезы с ножа ротационного микротома можно кисточкой или препаровальной иглой.

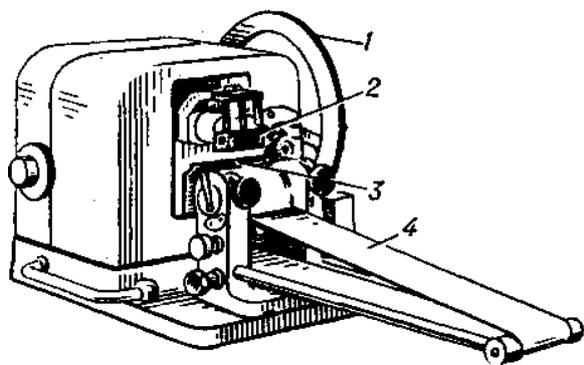


Рисунок 99 – Микротом для резки объектов, залитых в органический наполнитель: 1 – устройство, приводящее в движение механизм подачи объектодержателя с объектом на нож; 2 – объектодержатель; 3 – нож; 4 – транспортная лента для приема и расправления срезов

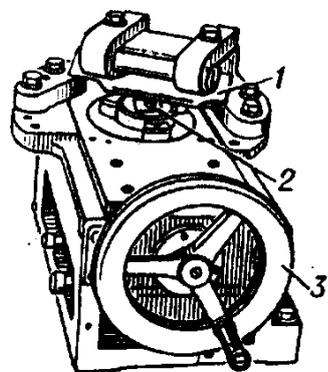


Рисунок 100 – Ротационный микротом для резки объектов без декальцинации: 1 – нож; 2 – объектодержатель; 3 – устройство для движения каретки с объектодержателем

Замораживающий микротом используют для получения срезов животной или растительной ткани в замороженном состоянии (рис. 101), также их используют для резки не залитых, но фиксированных объектов, материала, залитого в желатин и водорастворимые пластмассы. Особенно широко применяются замораживающие микротомы для изготовления препаратов при исследовании материала срочных биопсий. В нем объект замораживают жидкой углекислотой, подводимой от баллона к столику микротома гибким шлангом в металлической оплетке, выдерживающим высокое давление.

К подобным микротомам также прилагают отдельно замораживающие столики (рис. 102), на которых объект замораживают электрическим током, проходящим через полупроводниковые элементы, вмонтированные в столик.

По своей конструкции замораживающие микротомы относят к микротомам санного типа, но в их устройстве есть некоторые особенности. Станина имеет приспособление для крепления к столу. Нож устанавливают под нужным углом в подвижной ручке с помощью одного или двух зажимов. Автоматическая подача осуществляется при каждом размахе ручки с ножом через систему рычагов. Замораживающий столик снабжен приспособлением для подачи углекислоты или охлаждается термоэлектрически с помощью полупроводниковых элементов.

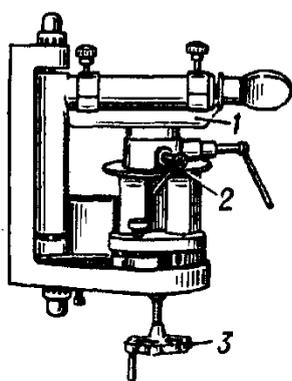


Рисунок 101 – Микротом замораживающий с охлаждаемым ножом:
1 – нож; 2 – замораживающий столик;
3 – устройство, приводящее в движение механизм подачи объектодержателя с объектом к ножу

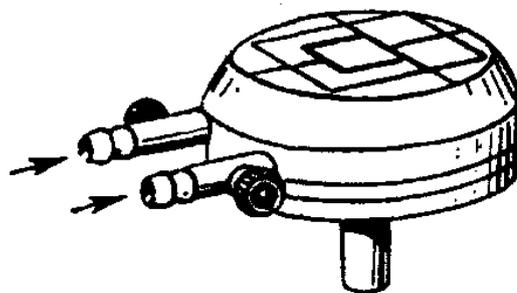


Рисунок 102 – Замораживающий столик (стрелками указано подключение к столику напряжения)

Микротом для резки объектов, не подвергнутых декальцинации также имеет замораживающее устройство; он предназначен для производства срезов с костей.

Криостаты, вибраторы. С развитием гистохимии ферментов и иммуноморфологии возникла необходимость в обработке нефиксированного материала, которая была реализована с помощью специальных приборов – криостатов. Позднее появились *криокиты* и *вибраторы*.

Криостат – специализированная холодильная камера с установленным в ней микротомом, в которой имеются отверстия для рук,

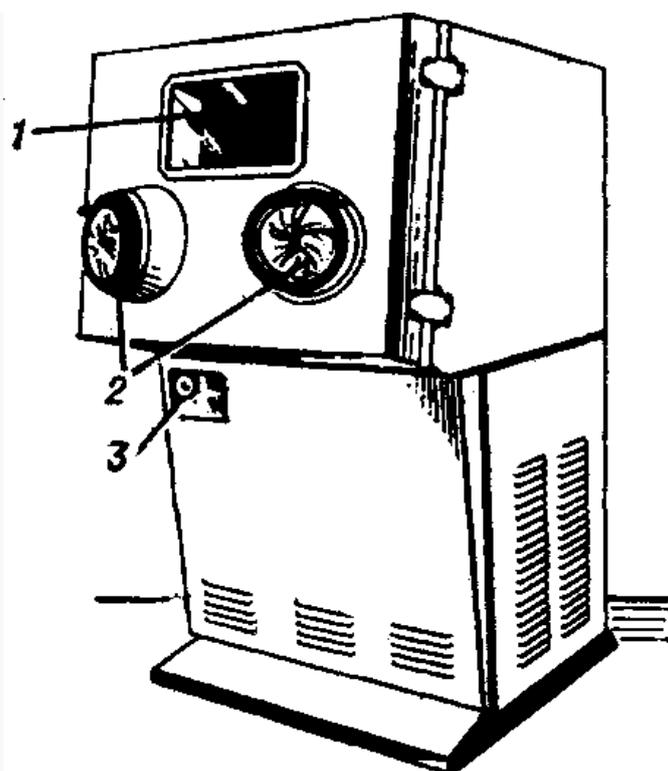
люминесцентная лампа и смотровое стекло. Надежная изоляция позволяет поддерживать в криостате температуру от -5 до -25 °С. Отрицательными моментами при работе с криостатом являются значительное переохлаждение рук оператора, недостаточная освещенность рабочего поля, а также невозможность ориентировать объект относительно кромки ножа. Эти недостатки практически устранены в *криостатах* зарубежного производства, управление которыми вынесено за пределы морозильной камеры. В них можно отдельно регулировать температуру объекта и ножа. Через 3–5 мин после включения прибора достигается низкая температура, причем охлаждение возможно до -65 °С, что предотвращает образование кристаллов в тканях.

Микрокриостат используют для сохранения среза в замороженном состоянии после снятия его с ножа, который представляет собой небольшую холодильную камеру, прикрепленную к замораживающему микротому, в которой при помощи жидкой углекислоты можно регулировать температуру от 0 до -70 °С.

Криостаты с регулируемым охлаждением микротомного ножа используют для обеспечения качественного приготовления срезов на замораживающем микротоме. Они устроены таким образом, что в нижней части тела ножа находится клапан, соединяющий две камеры, в которых образуется сухой лед из углекислоты. Между телом ножа, изготовленным из меди, и режущей стальной пластинкой вмонтирован датчик температуры (термопара, термистор), при помощи которого осуществляют контроль за температурой ножа.

Микротом-криостат используют для получения срезов свежезамороженной ткани при экспресс-биопсии, а также для гистохимических исследований (изучения ферментных, антигенных и других белковых систем тканей) (рис. 103).

Микротом-криостат представляет собой термоизоляционную камеру с микротомом и системой охлаждения. Камера имеет двойные стенки, между которыми заложен теплоизоляционный материал, в дверках камеры – смотровое стекло. На передней стенке под углом расположены регулируемые по величине отверстия для рук, закрытые диафрагмами. В верхней части камеры находится испаритель системы охлаждения, на специальном столике укреплен микротом, в задней стенке камеры имеется люк для доступа к терморегулирующему вентилю, расположенному между внутренней и наружной облицовкой камеры. В камеру помещают влагопоглотитель.



*Рисунок 103 – Микротом-криостат:
1 – смотровое стекло; 2 – отверстие для рук; 3 – клавиши управления*

Система охлаждения состоит из холодильного агрегата, устройства автоматического регулирования, испарителя и соединительных трубопроводов. Холодильный агрегат вмонтирован в основание аппарата, там же расположена и система регулирования температуры.

Клавиши включения аппарата в работу и освещения совместно с рукояткой регулирования температуры вынесены в нишу передней стенки основания. Шкала термореле расположена слева в окне боковой стенки основания аппарата. Микротом-криостат позволяет получать гистологические срезы нефиксированной ткани.

Все манипуляции с кусочком ткани производят в условиях охлаждения в камере аппарата.

Ультрамикротомы

Для приготовления сверхтонких срезов, необходимых для электронно-микроскопических исследований, применяют ультрамикротомы (рис. 104), где выполнение всех операций приготовления среза препарата и внесение его в поле микроскопа полностью автоматизировано.

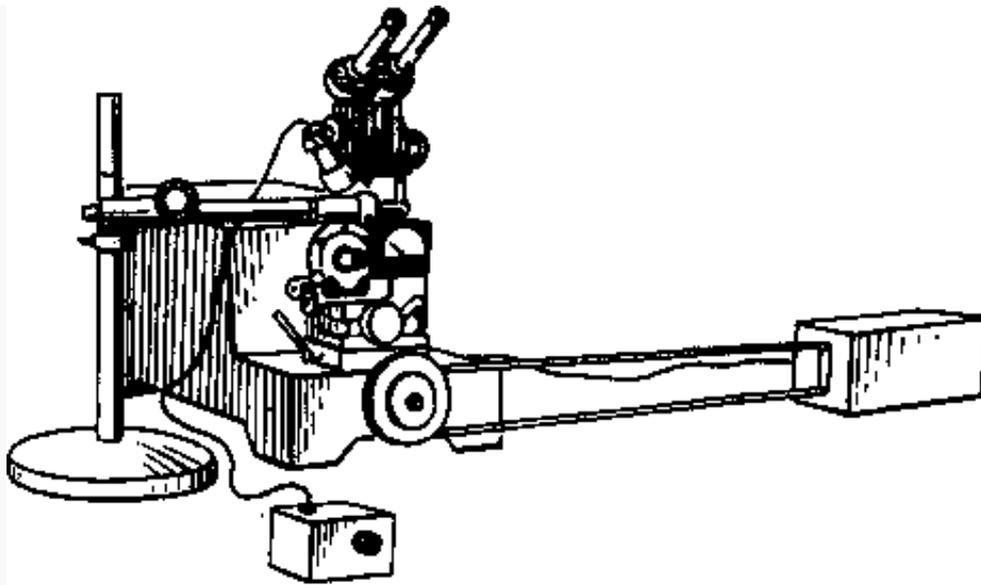


Рисунок 104 – Ультрамикротом тепловой УМТ-2

Резание во всех ультрамикротоме осуществляют посредством перемещения стержня с исследуемым образцом относительно неподвижного ножа. Для равномерной подачи образца к ножу используют либо термическое расширение стержня, на котором закреплен образец, либо механическое. Изменяя число срезов в минуту и скорость подачи объекта к ножу, можно получать срезы любой толщины.

В ультрамикротоме с качающейся системой стержень с образцом колеблется в вертикальной плоскости, во время холостого хода предусмотрено либо отклонение ножа, либо отведение назад стержня с образцом. Ультрамикротомы УМТ-2 обеспечивают получение срезов толщиной от 15 до 90 нм; УМТ-5 – от 5 до 100 нм.

Микротомные ножи

Для получения гистологических срезов применяют специальные *микротомные ножи*, различающиеся по форме, длине и углу сечения лезвия. По форме они представляют собой сложный стальной клин, у которого режущий край имеет дополнительную клиновидную заточку. Длина ножа может составлять от 8 до 50 см.

По конфигурации лезвия различают три группы микротомных ножей: *A, B и C* (рис. 105):

- у микротомных ножей, относящихся к *группе A*, одна поверхность ровная, а другая вогнутая (их называют плоско-вогнутыми с большой кривизной вогнутой поверхности). Эти ножи чаще всего из-

готовлены из мягкой или относительно мягкой стали и предназначены для резки объектов, залитых в целлоидин;

- ножи, относящиеся к *группе В*, называются плоско-вогнутыми, но кривизна вогнутой поверхности у них значительно меньше, чем у ножей группы А. Они изготовлены из более твердой стали, используют их для приготовления целлоидиновых и целлоидин-парафиновых срезов;

- у ножей, относящихся к *группе С*, обе поверхности клинка плоские. Их изготавливают из твердой стали и применяют для резки объектов, залитых в парафин, а также для получения срезов на замораживающем микротоме.

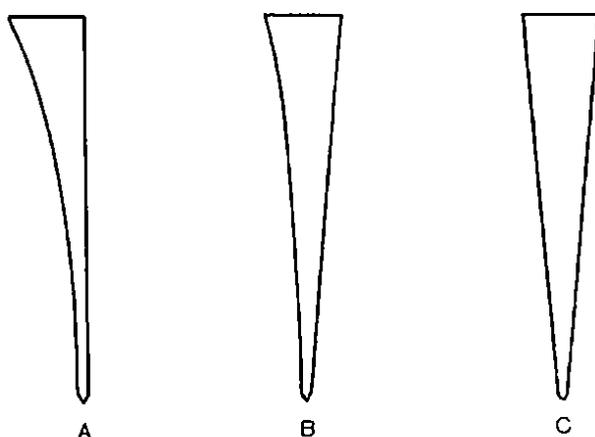


Рисунок 105 – Типы микротомных ножей (А, В, С)

Кроме того, для приготовления парафиновых и полутонких срезов на микротоме и ультратоме используют металлические магнитные лезвия и стеклянные ножи. Металлическое магнитное лезвие (одноразовый нож) позволяет получить срезы с 50–60 парафиновых блоков, затем лезвие меняют.

Станки для заточки микротомных ножей

Для заточки микротомных ножей существует ряд приспособлений и специальных станков.

Наиболее широко применяемый станок ЗМН-2 (рис. 106) обеспечивает быструю (в течение 5–7 мин.) высококачественную заточку микротомных ножей длиной от 180 до 500 мм. Угол заточки ножей от 20 до 30°.

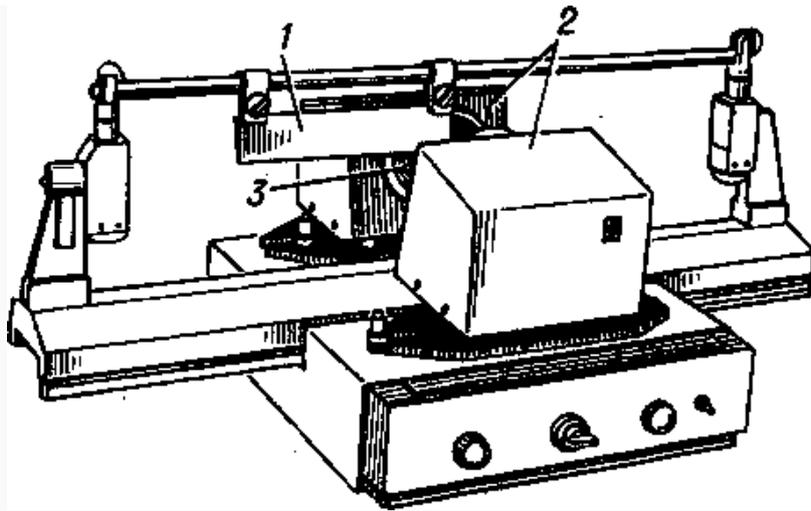


Рисунок 106 – Станок для заточки микротомных ножей ЗМН-2:
 1 – нож; 2 – кожухи, закрывающие точильные камни;
 3 – точильный камень

Заточка микротомных ножей

Получить качественные гистологические срезы при целлоидиновой, целлоидин-парафиновой и парафиновой заливке материала можно с помощью микротомного ножа, толщина лезвия которого должна быть от 3 до 5 мкм. Для работы на замораживающем микротоме необходимо иметь острый нож без зазубрин на лезвии. Нож необходимо своевременно точить, а перед каждой резкой объектов править.

Микротомные ножи затачивают с помощью специальных аппаратов, например, «Sakura» (Япония). Однако до сих пор не потеряла актуальности и применяется во многих лабораториях *ручная заточка ножей*. Вручную микротомные ножи точат на камне, имеющем форму бруска. Следует помнить, что получить хороший тонкий срез можно только при наличии правильно заточенного, очень острого микротомного ножа. Существует ряд способов точки ножей, но наиболее надежна до сих пор ручная точка на специальном точильном камне с последующей шлифовкой на ремне.

Уход за микротомами и микротомными ножами

Все скользящие поверхности микротомов должны быть чистыми и смазаны тонким слоем машинного или вазелинового масла. При постоянной работе на микротоме все скользящие поверхности необходимо один раз в неделю протирать тряпочкой, смоченной бензином или толуолом, и смазывать.

После окончания работы на микротоме объектодержатель и станину очищают от остатков парафина, предварительно вынув микротомный нож и убрав его в футляр. Микротомные ножи никогда не оставляют в микротоме или на рабочем столе.

Замораживающие микротомы и криостаты через 30 мин после выключения вытирают насухо и винтовую подачу смазывают вазелиновым маслом.

Установки для автоматической гистологической обработки тканей

Гистологический автомат

Автоматы для гистологии – это сложные комплексные приборы, предназначенные для фиксации, уплотнения и парафинирования тканей. Такие приборы значительно экономят время и создают дополнительный комфорт при выполнении исследовательских работ. Работая с таким автоматом, гистолог имеет возможность контролировать качество процесса и формировать правильные задачи при помощи удобной панели управления. В каждом конкретном автомате имеется свой набор гистологических программ (рис. 107, 108).

Станция для заливки в парафин – специальный прибор, переназначенный для автоматизированного приготовления исследуемого материала на определенном этапе работы, обеспечивающий высокую производительность работы и позволяющий получать качественные результаты.



Рисунок 107 – Гистологический автомат



Рисунок 108 – Станция для заливки в парафин

Дополнительное оборудование и организация гистологической лаборатории

Помимо перечисленных вариантов оборудования, в каждой лаборатории могут быть следующие приборы:

- *водяная баня для расправления срезов* – прибор позволяет без лишних трудностей осуществлять важный этап приготовления образцов для исследования;
- *нагревательные столы* – прибор, предназначенный для сушки препаратов;
- *прибор для заключения образцов*;
- *техническое обеспечение для архивации полученных данных и последующей обработки* (фотокамера, компьютер и т. д.).

Стоит отметить, что, помимо оборудования и инструмента, в гистологической лаборатории необходим полный набор специальных реактивов и химических веществ.

Учитывая, что результаты гистологических исследований представляют большую важность для постановки диагноза и выбора предпочтительного направления в терапии, стоит понимать, что высокое качество оснащения и высококвалифицированный штат – это залог успешности лаборатории.

При организации гистологической лаборатории необходимо уделять особое внимание каждой детали. Это в последующем обеспечит четкость и результативность работы означенной медицинской отрасли в каждом конкретном случае.

Аппараты для лиофилизации

Приготовление лиофилизированных материалов для гистологических исследований осуществляется в различных аппаратах для лиофилизации. Такие устройства имеют системы для создания глубокого вакуума. Ткань замораживают при помощи жидкого хладагента (углекислота, азот) при $t^{\circ} -90-160^{\circ}C$, а затем высушивают в вакууме и заливают парафином.

Микроманипуляторы

Микроманипуляторы – механические приспособления, используемые для работы с микроскопическими препаратами под микроскопом.

Оператор, используя микроманипулятор, который позволяет совершать точные микродвижения рабочими органами (тонкие иглы из

металла и стекла, пипетки, электроды), осуществляет весьма тонкие манипуляции с клетками и другими микроскопически малыми объектами.

Нагревательные столики

Используют при ряде исследований, например, при длительных наблюдениях над клетками и тканями, для изучения культур тканей, различных исследований с включением температурного фактора. Нагревательные столики легко монтируют на предметном столике микроскопа.

Нагревательный столик с автоматическим терморегулятором позволяет поддерживать температуру от 20 до 60 °С.

Виды исследования объектов в зависимости от их состояния

Для современного патогистологического исследования применяют разнообразные методы изучения объектов, позволяющие все-сторонне изучить их морфологию.

Главными этапами цитологического и гистологического исследования являются:

- 1) выбор объекта исследования;
- 2) подготовка его к микроскопированию;
- 3) применение методов микроскопирования.

Существуют два основных пути микроскопического исследования клеток и тканей в зависимости от их состояния:

- *исследование препаратов из живых клеток и тканей;*
- *исследование гистологических препаратов из неживых клеток и тканей (фиксированных), сохраняющих в той или иной мере морфологические особенности и химическую структуру, присущую данному виду тканей.*

Для изучения фиксированных объектов применяют многочисленные методы светоптической и электронной микроскопии.

В случае исследования препаратов из *неживых клеток и тканей*, оно начинается с забора объекта исследования, выбора способа фиксации, затем следует заливка препаратов и приготовление срезов, окрашивание и заключение препаратов в среды.

Виды гистологических препаратов из фиксированных клеток

По характеру взятого материала различают следующие виды гистологических препаратов из *фиксированных клеток* (рис. 109):

а) *срезы органов и тканей* (толщиной 5–15 мкм): толстые (5–10 мкм и более), тонкие (5–7 мкм), полутонкие (0,5–1 мкм), ультратонкие (0,005–0,2 мкм);

б) *мазки* крови, костного мозга, слюны и т. д.;

в) *отпечатки*, например, селезенки, тимуса;

г) *пленки* – брюшины, мягкой мозговой оболочки, или *тотальные препараты*.

Тотальные препараты – целые, нерасчлененные объекты: зародыши ранних стадий развития, тонкие пленки тканей и животных.

Чаще всего в качестве гистологических препаратов используют срезы.



Рисунок 109 – Виды гистологических препаратов из фиксированных клеток

Методы изучения фиксированных объектов

Несмотря на многочисленные методы витальной микроскопии и на их большое значение, наиболее полную картину строения клеток и тканей можно получить при параллельном изучении живых и фиксированных объектов.

Исследование фиксированных объектов дает возможность изучать структуру клеток и тканей неживых объектов.

Методы исследования в гистологии включают приготовление гистологических препаратов с последующим их изучением с помощью светового или электронного микроскопа.

В гистологической технике использование *тотальных препаратов* (мазки, отпечатки, пленочные препараты и т. п.) ограничено, и обычно приходится прибегать к изготовлению срезов тканей с помощью микротомов.

4.2.3. Гистологическая техника

Этапы изготовления гистологического препарата

Гистологические препараты представляют собой мазки, отпечатки органов, чаще тонкие срезы кусочков органов (толщиной 5–15 мкм), возможно окрашенные специальным гистологическим красителем, помещенные на предметное стекло микроскопа, заключенные в консервирующую среду и покрытые покровным стеклом.

Гистологические препараты должны отвечать следующим требованиям:

- сохранять прижизненное состояние структур;
- быть достаточно тонкими и прозрачными для изучения их под микроскопом в проходящем свете;
- быть контрастными, т. е., изучаемые структуры должны четко определяться под микроскопом;
- препараты для световой микроскопии должны сохраняться и использоваться для повторного изучения.

После забора материала выполняется его подготовка к исследованию, включающая в себя ряд этапов (рис. 110):

- *взятие и фиксация материала;*
- *проводка (обезвоживание материала);*
- *заливка (уплотнение материала);*
- *приготовление срезов;*
- *окрашивание;*
- *заклучение срезов в консервирующую среду.*

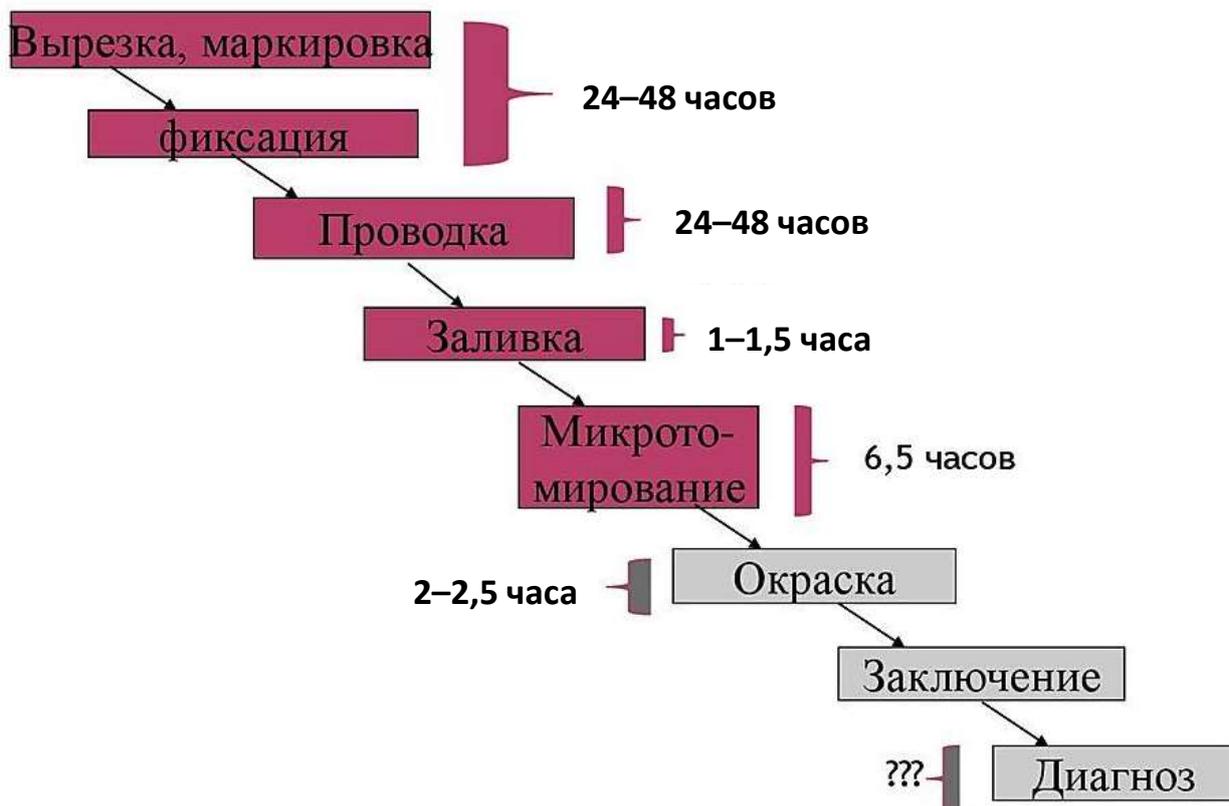


Рисунок 110 – Обработка материала и получение гистологического препарата (схема)

Особенности приготовления мазков и тотальных препаратов

Примеры тотального препарата – участки сальника или мягкой мозговой оболочки, растянутые на предметном стекле.

В подобных случаях, а также при приготовлении мазков, из 6-ти перечисленных этапов опускают два:

- уплотнение материала;
- приготовление среза (с последующим освобождением от уплотнителя).

При этом выполняют следующие этапы:

- фиксация;
- окраска;
- заключение в консервирующую среду.

Взятие и фиксация материала

Гистологический препарат изготавливают из органов и тканей, полученных несколькими путями:

- биопсия (пунктат)(см. тему б);
- хирургическая операция;

- *секционный (трупный) материал;*
- *экспериментальный материал.*

Важнейшими условиями получения высококачественных гистологических препаратов являются:

- возможно более раннее получение материала после смерти животного;
- при возможности взятие материала от живого животного (биопсия), для лучшего сохранения клеток и тканей;
- минимальное травмирование ткани: забор материала берется острым инструментом;
- толщина кусочка не должна превышать 5–7 мм для лучшей фиксации;
- обязательная маркировка кусочка: наименование органа, вид и кличка животного, дата забора материала, прижизненный и/или посмертный диагноз и т. д.;
- адекватная фиксация.

Правила забора материала на гистологическое исследование

Сбор материала является первым этапом в приготовлении гистологических препаратов, и от того, насколько правильно выполнена эта процедура, зависит успех всей работы.

Биопсийный и патолого-анатомический материал для гистологического исследования получают из патологически измененного очага: из его центральной зоны и зоны, граничащей с неизмененными тканями (в лаборатории эта процедура не выполняется). Иссечение кусочков тканей из органов следует производить только острым инструментом, предупреждая деформацию материала, что приводит к возникновению артефактов (рис. 111, 112).

Кусочки полых органов вырезают таким образом, чтобы в препарате были видны все слои стенки. Кусочки стенки полого органа удобно предварительно распластывать на фотобумаге или картоне. Для изучения стенки сосуда на большом протяжении его разрезают вдоль, свертывают в виде рулона и прошивают посередине. Для исследования рыхлой соединительной ткани готовят пленчатые препараты: после осторожной препаровки соединительнотканную пленку натягивают пинцетом на обезжиренное предметное стекло и фиксируют.



Рисунок 111 – Доска для вырезки операционного материала в патолого-анатомическом отделении: позволяет получать серию одинаковых таневых пластинок заданной толщины 1,5–2 мм



Рисунок 112 – Инструменты для вырезки операционного материала в патолого-анатомическом отделении

Не рекомендуется получать материал электроинструментами, так как в этом случае возможно выставить только предположительный диагноз. Иссеченный фрагмент ткани должен быть по возможности небольшого размера, плоской формы (не толще 3–5 мм), что обеспечивает его равномерную фиксацию (рис. 113).

В случае, когда биологический материал содержит примеси крови, до помещения в фиксирующую жидкость образец необходимо промыть в физиологическом растворе, поместив его в марлевый мешочек, а затем, удалив излишки промывной жидкости, поместить в фиксатор. Данное условие необходимо для полноценности гистологического исследования.



Рисунок 113 – Техника вырезки материала для гистологического исследования

После забора материала его необходимо сразу поместить в емкость с фиксатором. Фиксирующей жидкостью для хранения и транспортировки материала для гистологического исследования является 10 %-й нейтральный формалин (рис. 114). Нельзя применять формалин более высокой концентрации, а также с истекшим сроком годности. Соотношение объема исследуемого материала к объему формалина должно составлять не менее 1:10.

После погружения кусочков в сосуд с фиксатором туда же опускают этикетку с номером (шифром, маркировкой), написанным карандашом или тушью на матовой поверхности фотобумаги.

В тех случаях, когда возникает необходимость маркировки каждого кусочка, его вместе с этикеткой завязывают в марлевый мешочек. Возможно также нанизывание кусочков на нитку: сначала 2–3 раза прошивают этикетку первого кусочка, затем сам кусочек, потом следующую этикетку и так далее до 10–15 кусочков (рис. 115).

Если в ветеринарной клинике отсутствует формалин, то материал можно герметично упаковать в полиэтиленовый пакет или хирургическую перчатку и поместить в холодильник. В таком случае необходимо транспортировать ткань в лабораторию в течение суток.

Физиологический раствор и дистиллированная вода фиксаторами не являются. Нефиксированный материал подвергается аутолизу, в результате чего дальнейшему исследованию не подлежит.

Ткани ферментативных органов (кишечник, печень, поджелудочная железа) помещают в формалин незамедлительно и только в фиксированном виде отправляют в лабораторию.

Емкость должна быть плотно закрыта для предотвращения испарения формалина и высыхания биоматериала.

Материал в виде слизи, крови, экссудата или очень мелкий материал (менее 1 мм) не может расцениваться как полноценный для гистологического описания.

Категорически запрещается делить операционный или биопсийный материал на части и отправлять в разные патогистологические лаборатории, так как изменения, характерные для данного патологического процесса могут оказаться только в одной части объекта, что ведет к разным результатам исследования.

Материал в лабораторию сопровождают бланком-направлением (с обязательным заполнением всех рубрик).

Направление на патогистологическое исследование заполняют в двух экземплярах под копирку.

В направлении на патогистологическое исследование четко заполняют все графы. Бланк разборчиво подписывает лечащий врач или врач, взявший материал для исследования. Только совместные усилия клинициста и патолога дадут возможность пациенту получить верный диагноз.



Рисунок 114 – Взятие и фиксация тканей в растворе формалина



Рисунок 115 – Фиксация тканей в растворе формалина

Замечание по взятию и этикетированию материала из определенных органов и тканей

При иссечении материала необходимо максимально бережно обращаться с тканями: участки органа, подвергшиеся травмированию (например, при зажиме пинцетом), не следует оставлять для исследования.

Инструмент для вскрытия, особенно для взятия материала необходимо хранить отдельно, своевременно затачивать и не применять для других целей.

Благоприятные условия для фиксации создаются правильным выбором размера фиксируемого материала, ибо необходимо обеспечить равномерное и сравнительно быстрое проникновение фиксирующей жидкости во всю его толщину. Поэтому нужно вырезать кусочки толщиной не более 5–10 мм. Поперечный же и продольный размеры не имеют столь важного значения и определяются задачами исследования.

Следует помнить, что предупреждение исследуемого материала от высыхания является одним из важнейших условий. Поэтому производить вскрытие животных следует лишь после того, как подготовлено все необходимое для быстрой фиксации. Если подсыхание все же возможно, то исследуемый материал необходимо смачивать изотоническим раствором хлорида натрия, смачивание водой категорически воспрещается, так как в силу разности осмотического давления вода проникает в ткани и вызывает разрушение микроструктур (рис. 116).

Вырезание кусочков для фиксации является одним из ответственных этапов в приготовлении качественных микропрепаратов и в исследовательской практике и, как правило, должно производиться самим исследователем. Если же эту операцию выполняет лаборант, то он должен знать основные особенности анатомо-гистологического строения органов, чтобы правильно выбрать место и направление разреза, а также величину вырезаемого кусочка.

Так, если орган состоит из участков, различных по строению, необходимо производить разрез таким образом, чтобы все они попали в кусочек, а при невозможности – брать кусочки отдельно из каждого участка. Например, при взятии кусочков мозга или крупных животных приходится вырезать участки из определенных отделов. Из почки можно вырезать один кусочек, охватывающий всю толщину органа от капсулы до лоханки, что обеспечивает попадание в него всех слоев. Если же орган имеет однородное строение (большинство желез, мышцы), то выбор места для вырезания кусочка не имеет большого значения.

Особые приемы требуются для взятия материала, имеющего строение пленок, и из полых мышечных органов, выстланных слизистой оболочкой, так как пленки в фиксирующей жидкости сморщиваются, а стенка полого органа после разрезания вследствие сокращения мышечной оболочки изгибается дугообразно слизистой оболочкой наружу (кишечник, пищевод, желудок, мочевого пузыря и т. д.) (рис. 117). Поэтому прежде чем брать такой материал, необходимо ванночку или стеклянную чашку с плоским дном залить расплавленным воском так, чтобы толщина покрытия равнялась 1,5–2 см, и дать ему остыть. Следует также приготовить иглы для накалывания (металлические из нержавеющей стали, стеклянные или растительные), фиксирующие жидкости и лишь после этого приступить к взятию материала.

Вместо восковых подушек для накалывания препаратов можно применять пробковые пластинки, которые для удаления из них танина (дубящее вещество) следует предварительно несколько раз прокипятить в воде и хранить в 70–80 %-м спирте, а также кусочки картона.

Если необходимо приготовить гистологический препарат из стенки кишечника, иссекают нужный отрезок органа, ополаскивают его в изотоническом растворе хлорида натрия (чтобы не высохла серозная оболочка), разрезают вдоль (напротив брыжейки) и накалывают с помощью игл на восковую или пробковую подушку в расправленном состоянии слизистой оболочкой кверху. При расправлении нужно следить, чтобы не перерастянуть взятый кусочек, так как это приведет к искажению истинного взаимоотношения слоев и деформации тканей. Затем в чашку с воском наливают фиксирующую жидкость таким образом, чтобы струя не попадала на слизистую оболочку и чтобы весь материал был покрыт полностью (рис. 117).

При накалывании на пробку ее опускают в сосуд с фиксирующей жидкостью вниз стороной, к которой прикреплен объект. Подобным образом берут материал из стенки желудка и пищевода, а также объекты, имеющие пленочное строение (брыжейка, сальник, мозговые оболочки). После 1/2–2 ч пребывания в фиксирующей жидкости обрабатываемый материал освобождают от игл, вырезают кусочек, выбрав нужный участок, и помещают в сосуд с фиксатором для продолжения фиксации.

Применяют и другой способ фиксации небольших полых органов – без разрезания их стенок. Для этого нужный отрезок органа перевязывают с одного конца, заполняют фиксирующей жидкостью и, перевязав противоположный конец, помещают в сосуд с фиксатором. Этим достигается более быстрое проникновение фиксирующей смеси в ткани органа (одновременно с двух сторон) и сохранение естественной формы органа.

Для того чтобы легче было ориентировать кусочки полых органов в продольно-поперечном направлении при заливке и приготовлении микропрепаратов, необходимо взять за правило вырезать их таким образом, чтобы стороны имели различную длину и чтобы при этом длинная сторона кусочка соответствовала длинной оси органа (рис. 116).

Взятие материала из легкого также имеет некоторые особенности, ибо легкое всегда содержит воздух и ткань его плавает, не погружаясь полностью в фиксирующую жидкость. Для полного погру-

жения необходимо кусочек органа завернуть в марлю вместе с каким-либо грузом (стекло, фарфор, нержавеющей металл), а если нужно фиксировать долю или все легкое, то груз привязать к трахее или бронху (рис. 116).

При взятии материала из кости необходимо выпиливать кусочки мелкозубчатой пилой (костной или лобзиком). Это позволяет сохранить архитектуру исследуемой костной ткани.

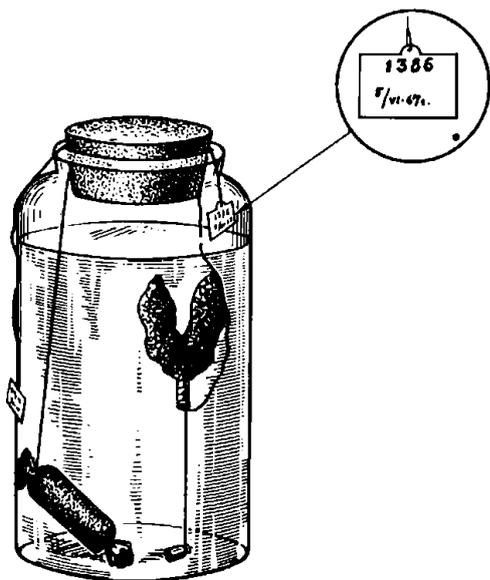


Рисунок 116 – Фиксация тканей легкого и кишечника

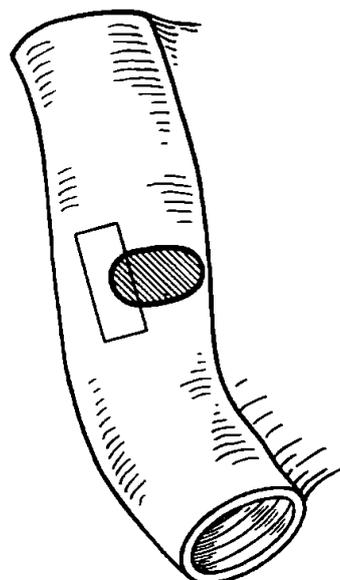


Рисунок 117 – Вырезание кусочков из пораженного участка органа

Техника взятия мазков и отпечатков

Помимо гистологических препаратов в виде срезов, полученных с кусочков органов, следует упомянуть о мазках и отпечатках. Первые находят широкое применение при исследованиях костного мозга и периферической крови, вторые – паренхиматозных органов и эпителиальных покровов слизистых оболочек.

Общим и обязательным условием для приготовления таких препаратов является наличие тщательно вымытых и обезжиренных предметных стекол, а для мазков еще и стекол с отшлифованными поперечными ребрами.

Техника приготовления отпечатков

Вырезают из исследуемого органа (селезенка, печень, лимфатический узел) небольшой кусочек, один из краев которого срезают лезвием так, чтобы поверхность его была как можно ровнее. По-

сколько отпечаток должен быть достаточно тонок, необходимо сначала сделать несколько отпечатков на фильтровальной бумаге, а затем аккуратно произвести отпечатки органа на тщательно обезжиренном, чистом предметном стекле.

Приготовленные мазки и отпечатки подсушивают при комнатной температуре, после чего фиксируют и окрашивают по избранной методике.

Взятие материала от трупов животных с целью приготовления гистологических препаратов также производят по изложенным выше правилам. Имеющиеся же особенности в технике вскрытия, осмотра, протоколирования и другому изложены в специальных руководствах и не касаются непосредственно гистологической техники.

Особенность взятия материала из патологически измененных органов животных: вырезать кусочек следует таким образом, чтобы в него попала зона перехода очага поражения в нормальный участок с прилежащими территориями здоровой и измененной ткани, необходимо также взять отдельные кусочки из обоих участков.

Для того чтобы точно знать, какой материал взят для фиксации, от какого животного, из какого органа и когда, необходимо сразу же произвести его этикетировку.

Наиболее распространенный способ – прошивание кусочков ниткой, на конце которой прикрепляется маленькая бирка из картона или плотной бумаги с обозначением простым карандашом номера животного (соответствующего протокольной тетради), даты взятия, названия органа, а также схемы ориентации кусочка.

Если кусочек или орган не могут быть прошиты, то их перед погружением следует завернуть в марлю и перевязать ниткой, снабженной на конце этикеткой. Надпись на бирке необходимо делать только простым карандашом во избежание размывания при помещении в раствор.

Техника приготовления мазков

Для морфологического исследования клеток крови и подсчета лейкоцитарной формулы готовят мазок крови. Правильно сделанный и хорошо окрашенный мазок является совершенно необходимым условием для получения достоверных результатов при изучении морфологических особенностей кровяных клеток и подсчете лейкоцитарной формулы.

Мазок крови должен отвечать следующим требованиям (рис. 118–119):

1) начинаться на 1 см от начала предметного стекла и кончаться на расстоянии 2–3 см от его противоположного края, общая длина мазка должна охватывать $1/2$ – $3/4$ стекла;

2) быть равномерной толщины, а не волнообразным, хороший мазок толще всего вначале, затем постепенно истончается и заканчивается в виде следа («вид щеточки»);

3) слой крови не должен достигать краев стекла, между ним и краем стекла всегда должно быть несколько миллиметров свободного пространства. Мазки, превышающие $3/4$ длины предметного стекла, бывают очень толстыми. В них эритроциты лежат густым слоем, прижаты друг к другу и образуют монетные столбики, что мешает исследователю рассмотреть их морфологию. Мазки короче $3/4$ предметного стекла слишком тонкие: лейкоциты лежат очень редко и деформированы. Если отсутствует свободный от мазка край предметного стекла (что бывает при большом диаметре шлифовального стекла), то большие клетки перемещаются к краю мазка, вследствие чего неравномерно распределяются в нем (рис. 118).

В волнообразном мазке распределение клеток крови также неправильное – толстые участки содержат больше лимфоцитов, тонкие – больше моноцитов и сегментоядерных клеток (рис. 119).

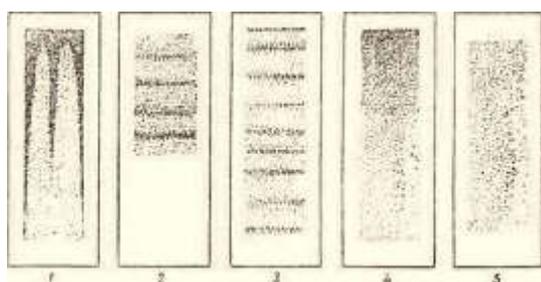


Рисунок 118 – Правильно и неправильно приготовленные мазки: 1 – мазок изготовлен на плохо обезжиренном стекле; 2 – слишком короткий мазок; 3 – слишком длинный неравномерный мазок; 4 – слишком толстый мазок; 5 – правильный мазок, тонкий, равномерный и достаточно длинный

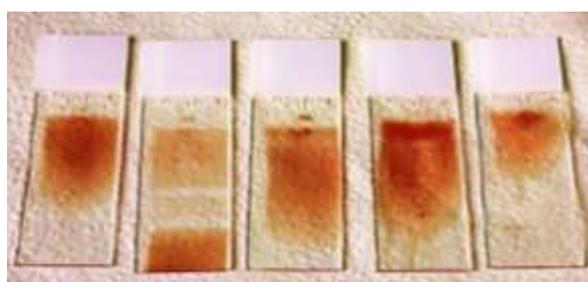


Рисунок 119 – Мазки крови (слева направо): мазок 1 – удовлетворяет всем требованиям; мазок 2 – в момент размазывания мазка произошла остановка; мазок 3 – перекося мазка; мазок 4 – капля крови слишком большая; мазок 5 – мазок слишком короткий

Предметные стекла, на которых будут делать мазки крови, должны быть хорошо обезжирены и промыты. Для этой цели их помещают в раствор хромпика (смесь $K_2Cr_2O_7$ + крепкая H_2SO_4) на 24 ч (с хромпиком надо обращаться крайне осторожно, так как брызги от него могут прожечь одежду). Затем стекла промывают под проточной водой в течение 24 ч, протирают насухо и кладут в банку со спирто-эфирной смесью. Перед употреблением их сушат.

К капле крови прикасаются предметным стеклом так, чтобы оно не касалось кожных покровов. Капля крови переходит на стекло (рис. 120, 121).

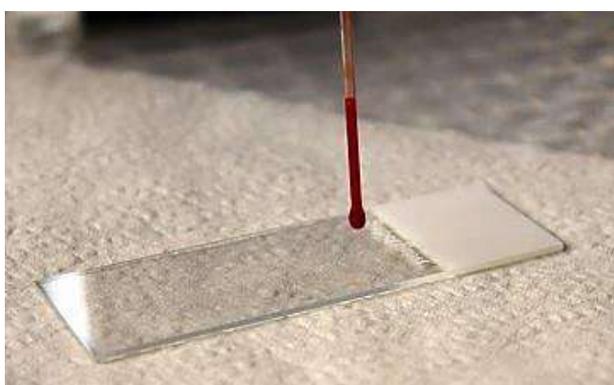


Рисунок 120 – Техника приготовления мазка крови: помещение капли венозной крови на предметное стекло с помощью стеклянной капиллярной пипетки

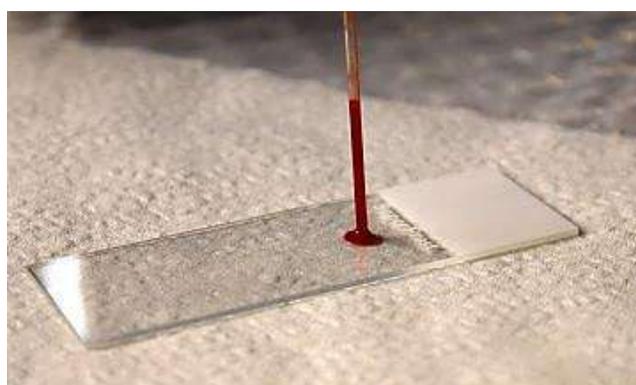


Рисунок 121 – Техника приготовления мазка крови: оставляют стекло в горизонтальном положении

Для того чтобы мазок был величиной в $1/2$ – $3/4$ предметного стекла, капля должна быть диаметром 2–5 мм. Предметное стекло берут в левую руку большим, указательным и средним пальцами так, чтобы капля крови была сверху. Шлифованное стекло, которым будут делать мазок, ставят под углом 30 – 45° на расстоянии 1–2 мм перед каплей, держа его большим и указательным пальцами правой руки. Шлифованное стекло сдвигают назад так, чтобы оно коснулось капли крови и капля растеклась в углу между шлифованным и предметным стеклом (движение назад помогает также убрать лишнюю кровь, если капля была слишком большой) (рис. 122, 123).



Рисунок 122 – Техника приготовления мазка крови: с помощью чистого шлифованного стекла, помещая его под углом 45°; коротким ребром, размазывают каплю крови по стеклу, подождав, пока вся кровь расплывется по нему

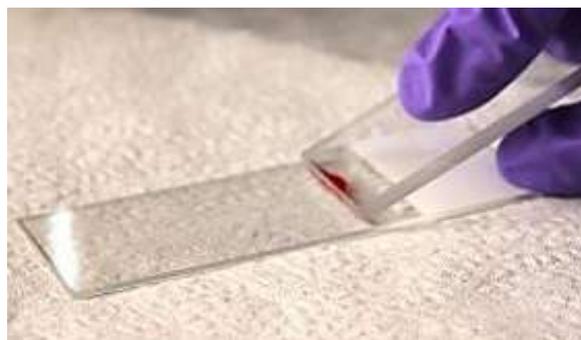
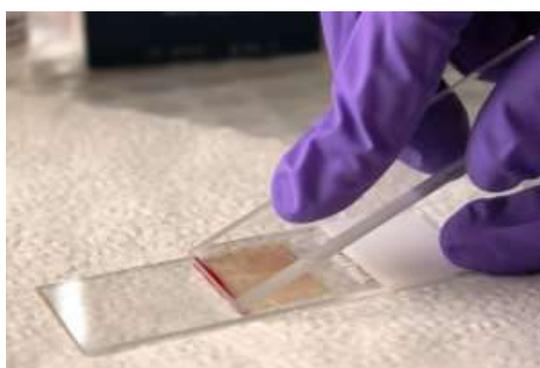


Рисунок 123 – Техника приготовления мазка крови: как только кровь растеклась по ребру шлифовального стекла, быстрым движением от капли проводят по предметному стеклу

Затем быстрым движением руки вперед делают мазок. Нужно, чтобы при приготовлении мазка большой и указательный пальцы правой руки скользили по краям предметного стекла и создавали необходимую опору для равномерного наложения слоя крови. Шлифованное стекло должно быть уже, чем предметное, чтобы края предметного стекла были свободны от мазка. Если ширина шлифованного стекла такая же, как и предметного, то углы у шлифованного стекла отламывают, укорачивая на 1–2 мм. Шлифованное стекло можно заменить покровным (рис. 124, 125).



А



Б

Рисунок 124 – Техника приготовления мазка крови: быстрым движением руки вперед делают мазок (А), доводя до ¾ длины предметного стекла (Б)

Приготовление хорошего мазка крови, хотя и не является трудным делом, требует определенного навыка. Следует помнить, что не-

верно приготовленный мазок приводит к грубым ошибкам в результатах исследований. Качество мазка является до некоторой степени «аттестатом» работы лаборанта (рис. 125).

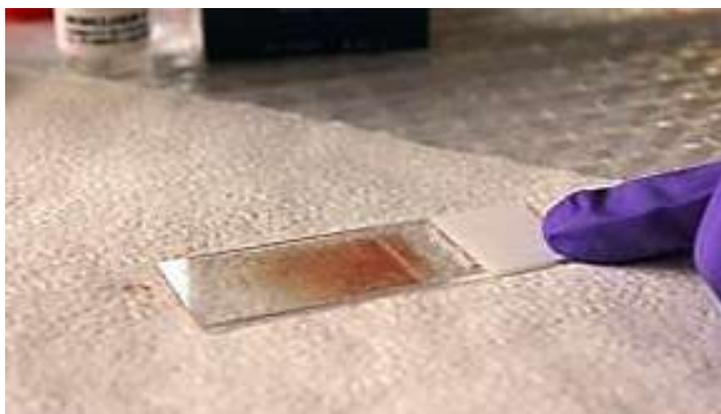


Рисунок 125 – Техника приготовления мазка крови: высушивание готового мазка на воздухе до исчезновения влажного блеска

Приготовление толстой капли крови

Три капли крови, нанесенные на предметное стекло на некотором расстоянии друг от друга, расширяют углом чистого предметного стекла до размера в диаметре примерно 1 см, маркируют карандашом, затем подсушивают на воздухе в течение 1–2 ч.

Фиксация

Фиксация (от лат. *fixatio* – закрепление) – сохранение структуры клеток тканей и микроорганизмов путем быстрого воздействия на них химическими или физическими агентами, предотвращающими развитие посмертных изменений; привнесение артефактов при этом минимальное.

Некоторые методы фиксации позволяют в известной степени сохранить и химическую структуру клеток и тканей.

При фиксации фрагмент ткани обрабатывают формалином, реже – спиртами, пикриновой кислотой и др. Такая обработка предотвращает распад клеток и разрушение структуры ткани под действием собственных ферментов клеток и процессов гниения, таким образом, сохраняя прижизненную структуру и делая возможным изучение ткани.

Принцип действия фиксирующих жидкостей основан на быстрой гибели клеток и коагуляции белка.

Наиболее распространенный тип фиксации – *иммерсионная* (от лат. *immersio* – погружение), при которой фрагмент ткани целиком погружают в раствор; в экспериментальных условиях также используют *перфузионную фиксацию* (от лат. *perfusio* – вливание), при которой фиксатор вводят через сосудистую систему. При этом используют как технический формалин (марка ФМ ГОСТ 1625-89), так и подготовленный («забуференный» формалин), который отличается большей стабильностью – не образуется белый осадок, свойственный техническому формалину при температуре ниже 40 °С.

Способы фиксации

Выбор способа фиксации зависит от задач исследования и особенностей объектов:

– при исследовании клеточных ядер и хромосом обычно используют *кислые фиксаторы*;

– при исследовании ферментативной активности применяют *ацетон, формальдегид (муравьиный альдегид) или глутаральдегид*, вызывающие минимальную денатурацию белка и сохраняющие многие ферментные системы.

Большинство фиксаторов применяют в виде растворов, действующих главным образом на белковые компоненты клеток и тканей. Входящие в состав фиксирующих смесей вещества (формальдегид, сулема и т. д.) образуют прочные связи между белковыми молекулами:

– *формальдегид* реагирует с аминами, карбоксильными и индольными группами белка, в результате чего между белковыми молекулами образуются метиленовые мостики;

– *сулема* действует на сульфгидрильных, карбоксильные и аминокислотные группы белка, образуя ртутные мостики между белковыми молекулами;

– *соли хрома* вызывают окисление и осаждают белки и фосфолипиды.

Широкое распространение получили фиксаторы, содержащие пикриновую кислоту. Одним из лучших фиксаторов для исследования цитологических объектов является *четырёхокись осмия* (OsO_4), часто используемая для фиксации объектов, подвергающихся электронной микроскопии. Универсальным фиксатором является формальдегид, применяемый в виде 10 %-го раствора формалина.

Выбор фиксирующей смеси. При выборе фиксирующих смесей необходимо учитывать проницаемость ткани для разного вида фиксаторов. В случае медленного проникновения фиксатора в тканях могут

развиться деструктивные изменения, связанные с аутолитическим действием ферментов, аноксией и т. п. Например, в фиксируемую ткань плохо проникает четырехокись осмия. Поэтому в растворах осмия фиксируют кусочки тканей толщиной не более 0,5–1,0 мм.

При проведении гистохимического исследования необходимо знать, как влияет та или иная фиксирующая смесь на различные химические компоненты клеток и тканей. Так, для исследования растворимых соединений используют методы замораживания-высушивания (*высушивание, лиофилизация*), а также замещения в замороженном состоянии.

Лиофилизация – состоит в быстром замораживании ткани (обычно используют жидкий азот) и ее обезвоживании (сушке) в вакууме при температуре 30–40 °С.

При *методе замещения в замороженном состоянии* – замороженные при температуре жидкого азота ткани затем выдерживают при температуре 20–60 °С в реактиве, растворяющем кристаллы льда (этиловый и метиловый спирт, ацетон). Оба названных метода позволяют сохранить химический состав клеток и тканей практически неизменным.

Чтобы фиксация была равномерной и полной, кусочки ткани должны быть небольшими, а объем фиксирующей жидкости – во много раз превосходить объем фиксируемого материала.

По окончании фиксации кусочки обычно промывают в воде или спирте.

Декальцинация

Твердые компоненты, имеющиеся в ткани (кость, хитин, отложения извести и др.), размягчают воздействием кислот или с помощью постоянного электрического тока – так называемая электролитическая *декальцинация* и после удаления из ткани кислоты приступают к изготовлению постоянных препаратов.

Общие принципы фиксации

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов.

Фиксация всегда приводит к большим или меньшим изменениям структуры и объема ткани, степень выраженности которых зависит от следующих факторов:

- рН фиксатора – концентрация ионов водорода фиксатора должна соответствовать таковой в тканях, поэтому фиксатор должен иметь рН, близкий к нейтральному;

- концентрации фиксатора;
- температуры фиксатора – увеличение температуры фиксатора ускоряет процесс, но вызывает еще большие изменения в тканях;
- продолжительности воздействия фиксатора – слишком продолжительная фиксация приводит к значительному уплотнению материала, что в дальнейшем затрудняет его обработку.

Для каждого конкретного вида исследования подбирают наиболее приемлемый фиксатор. Чем меньшую деформацию будут претерпевать тканевые структуры при фиксации, чем быстрее и глубже будет их действие на ткань, тем лучшей считается фиксирующая жидкость.

Требования, предъявляемые к фиксации

Полноценная фиксация материала обеспечивается при соблюдении ряда требований:

- после вырезки кусочка ткани его немедленно погружают в фиксатор;
- объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 10–20 раз, так как тканевая жидкость может существенно изменить концентрацию фиксатора;
- в том случае, если цвет фиксатора изменяется после погружения в него кусочков ткани, фиксатор необходимо немедленно сменить;
- недопустимо повторное использование фиксаторов;
- для каждого фиксатора следует соблюдать установленное время фиксации. Длительное пребывание материала возможно лишь в некоторых фиксаторах, например, 10 %-м нейтральном формалине, жидкости Буэна;
- для фиксации лучше использовать емкости с широким горлом, чтобы не возникло проблем с извлечением фиксированного материала;
- равномерность фиксации некоторых рыхлых тканей, например легочной, достигается помещением их на дно банки, а поверх них – прокладки из слоя марли или ваты. Данный прием позволяет избежать дефекта фиксации кусочков легочной ткани в виде прилипания их к покрывающей банку перчаточной резине с последующем развитием аутолиза в кусочке. при большом количестве материала кусочки переслаивают ватой или марлей;
- чаще материал фиксируют при комнатной температуре, но для некоторых видов исследования (гистохимических, электронно-микроскопических и др.) необходимо проводить фиксацию при 4 °С;

- материал срочных биопсий фиксируют при повышенной температуре фиксатора. При ускоренной фиксации в глубине объекта быстро развиваются аутолитические процессы;
- фиксацию можно считать законченной после того, как жидкость полностью пропитала фиксируемый объект. Равномерная окраска и одинаковая консистенция тканей на поверхности разреза свидетельствуют о том, что процесс фиксации завершен.

Простые фиксирующие жидкости

Формалин

Основным, широко применяемым фиксатором служит формалин, представляющий собой 40 %-й раствор формальдегида. Из него готовят нейтральный (забуференный до рН 7,0) 10–12 % формалин. Для этого в банку с 40 %-м формалином засыпают карбонат кальция или магнезия либо смесь этих солей – доломит из расчета 100 г на 1 л формалина.

Для получения 10 %-го нейтрального формалина через 24 ч к 1 части 40 %-го нейтрального формалина добавляют 9 частей водопроводной воды. Продолжительность фиксации – 24–48 ч при 20 °С.

Универсальным фиксатором, пригодным для гистологических и большинства гистохимических исследований, является нейтральный *формалин по Лилли*.

- а) 100 мл 40 %-го формалина + 900 мл дистиллированной воды;
- б) 4 г дигидроортофосфата натрия моногидрата (однозамещенного фосфата натрия);
- в) 6,5 г гидроортофосфата натрия (двухзамещенного фосфата натрия).

Если на дне банки с 40 %-м формалином образовался осадок белого цвета (параформальдегид), то его можно растворить, подогрев до 70–80 °С (в вытяжном шкафу!), и использовать для фиксации.

Этиловый спирт (80 %-й, 90 %-й, 96 %-й и 100 %-й)

Его применяют в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку.

Продолжительность фиксации от 2 ч до 1 сут. Увеличение длительности фиксации, особенно в 100 %-м спирте, нежелательно, так как материал значительно уплотняется и происходит его пересушивание.

Оптимальная температура для фиксации материала в спирте +4 °С, но ее можно проводить и при комнатной температуре. Если после спиртовой фиксации предстоит резать ткань на замораживающем микротоме или криостате, то кусочки промывают в течение 1–2 ч до их полного погружения на дно банки, при этом происходит насыщение ткани водой.

Ацетон

Действие ацетона подобно действию спирта. Ацетон используют для увеличения скорости фиксации. Применяют 100 %-й ацетон, для получения которого в коммерческий ацетон засыпают прокаленный сульфат меди (медный купорос) или силикагель.

В ацетоне фиксируют кусочки толщиной 3–4 мм в течение 2 ч при 20 °С или 30 мин – 1 ч в термостате при 60 °С в плотно закрытой посуде.

Ацетон значительно уплотняет ткань и при увеличении продолжительности фиксации возможно сморщивание объектов. Чаще ацетон применяют для обработки материала срочных биопсий при его заливке в парафин.

Сулема (дихлорид ртути)

Сулему применяют в качестве фиксатора с начала развития гистологии. Готовят насыщенный раствор: 10 г сулемы на 100 мл дистиллированной воды или изотонического раствора хлорида натрия доводят до кипения, охлаждают, фильтруют. Продолжительность фиксации кусочков толщиной 3 мм 6–12 ч при 20 °С. При фиксации сулемой возможно появление в тканях кристаллического осадка, который удаляют путем обработки срезов йодированным 70 %-м спиртом (на 50 мл 70 % спирта – 5–10 капель 5 % спиртового раствора йода до появления оранжевого цвета). По мере обесцвечивания йодированного спирта со срезами его заменяют свежей порцией вплоть до полной потери цвета, затем срезы промывают в 3–4 сменах 70 %-го спирта.

Сложные фиксаторы

В практической работе обычно сложные фиксирующие жидкости не используют, однако в исследовательской работе им часто отдают предпочтение перед формалином и этанолом в связи с более высоким качеством фиксации отдельных клеточных и тканевых структур, меньшим числом артефактов фиксации и лучшим сохранением тинкториальных свойств тканей.

Составными частями сложных фиксаторов являются простые. Существует множество вариантов фиксирующих смесей. Ниже приведены наиболее распространенные.

Спирт-формол по Шафферу: 10 %-й нейтральный формалин, который готовят из 1 части нейтрального 40 %-го формалина и 2–3 частей 96 %-го спирта.

Продолжительность фиксации – 24–48 ч. Дальнейшая промывка в воде не требуется, и материал сразу же помещают в 96 %-й спирт.

Солевой формол:

- нейтральный 40 %-й формалин – 100 мл;
- хлорид натрия – 8,5 г;
- водопроводная вода – 900 мл.

Продолжительность фиксации – 48 ч при 20 °С с последующей промывкой в проточной воде в течение 6–12 ч.

Жидкость Буэна (классический фиксатор для экспериментальных исследований):

- насыщенный раствор пикриновой кислоты – 75 мл;
- нейтральный 40 %-й формалин – 25 мл;
- ледяная уксусная кислота – 5 мл.

Продолжительность фиксации – 24 ч при 20 °С.

Насыщенный раствор пикриновой кислоты готовят заранее из расчета 3 г кристаллической пикриновой кислоты на 1 л горячей дистиллированной воды. После фиксации кусочки отмывают от избытка пикриновой кислоты в 70 %-м спирте, затем заливают в парафин.

Кальций-формол по Бейкеру (используют для фиксации липидов):

• раствор А: 10 мл 40 %-го формалина + 90 мл дистиллированной воды;

- раствор Б: 1 г хлорида кальция.

Компоненты А и Б смешивают.

Продолжительность фиксации: 24–48 ч при 20 °С.

Жидкость Карнуа (универсальный фиксатор для большинства гистологических и гистохимических исследований, кроме выявления липидов):

- спирт – 100 %-й или 96 %-й – 60 мл;
- хлороформ – 30 мл;
- ледяная уксусная кислота – 10 мл.

Продолжительность фиксации: 2–4 ч при 4 °С или 1–2 ч при 20 °С. Затем материал помещают в 100 %-й спирт. Если материал не

сразу подлежит проводке, то его можно перенести в 96 % спирт и держать в нем до 3 сут.

Используют также фиксатор *Карнуа I*, в состав которого входят 75 мл 100 %-го спирта и 25 мл ледяной уксусной кислоты. Условия фиксации те же.

В случае отсутствия этилового спирта вместо жидкости Карнуа можно использовать смесь следующего состава:

- изопропиловый спирт – 60 мл;
- пропионовая кислота – 30 мл;
- ацетон – 10 мл;
- диоксан – 10 мл.

Продолжительность фиксации: 12–24 ч при 20 °С; для промывки и обезвоживания применяют изопропиловый спирт.

Декальцинация костной ткани

Декальцинацию проводят после полной фиксации ткани, при этом необходима последующая тщательная промывка материала (1–3 ч) в слабощелочных растворах. Декальцинирующая жидкость состоит из 100 мл 90 %-й муравьиной кислоты, 80 мл 38,8 %-й соляной кислоты (удельный вес 1,19) и 820 мл дистиллированной или водопроводной воды. Объем декальцинирующей жидкости должен значительно превышать объем декальцинируемого объекта (в 10–20 раз). Небольшие кусочки компактной кости (1–2 г) декальцинируются при температуре 24 °С за 12–24 ч.

Правила работы с фиксаторами

Практически все фиксаторы относят к токсичным веществам: альдегиды, ацетоны, спирты. Некоторые ядовиты: сулема, тетраоксид осмия, метанол, поэтому необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с реактивами, которые используют в гистологической практике.

Фиксацию и вырезку материала необходимо производить в вытяжном шкафу. Материал, извлеченный из фиксатора, содержащего формалин, желательнее в течение нескольких минут промыть в проточной воде, так как пары формалина оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и органов дыхания.

Возможные артефакты, связанные с фиксацией, и их устранение

При фиксации формалином, особенно кислым, возможно появление в срезах темно-коричневого пигмента в виде зернышек или глыбок (результат реакции формалина с гемоглобином ткани).

Пигмент удаляют, помещая срезы на 15–20 мин в 1–5 %-й раствор аммиака или 70 %-й спирт. После промывания водой препарат можно окрашивать. Хорошо удаляется пигмент в растворе 1 %-го гидроксида калия в 80 %-м спирте (1:25): после 10-минутной экспозиции препарат промывают в проточной воде в течение 5 мин.

В случаях значительного уплотнения ткани в результате слишком продолжительной фиксации кусочки помещают на 1–2 ч в 10 %-й раствор лимонной кислоты (материал становится более мягким и пригодным для исследования).

Кристаллический осадок, образующийся после фиксации с применением сулемы, удаляют из кусочков или лучше срезов с помощью йодированного 70 %-го спирта.

Гистолог при исследовании микропрепаратов должен учитывать ряд возможных артефактов, вызванных фиксацией материала:

1. *Развитие в тканях аутолиза при крупных размерах объектов или плохой их фиксации*, при этом оценка срезов ограничена – нельзя высказаться достоверно о степени выраженности отека тканей, степени выраженности дистрофических изменений клеток, клеточной реакции, так как на фоне аутолиза клеточные элементы распадаются (рис. 126, 127).

2. *Сжатие тканей при их фиксации* может достигать до 40 % от первоначального объема, а также набухание тканей при фиксации приводят к артефактам при микроморфометрии (например, увеличение количества лейкоцитов в поле зрения микроскопа при фиксации объекта мягких тканей 72 часа и более по сравнению с этим же кусочком мягких тканей, фиксированным 24–48 часов).

3. *Механическое повреждение тканей при вскрытии черепа или исследовании головного мозга* – сморщивание, гиперхромия ядер нейронов, их деформация.

4. *Периваскулярные и перицеллюлярные щели* – постоянный артефакт в центральной нервной системы, ошибочно диагностируемые как периваскулярный и перицеллюлярный отек и др.

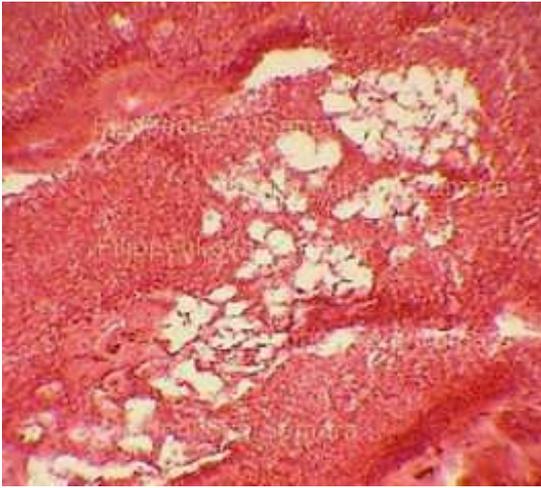


Рисунок 126 – Очаги гнилостной эмфиземы в ткани печени, выраженный аутолиз (окраска гематоксилин Эрлиха и эозин; x100)



Рисунок 127 – Очаги гнилостной эмфиземы в ткани почки, выраженный аутолиз (окраска гематоксилин Эрлиха и эозин; x100)

Проводка (обезвоживание) материала

Проводка – процесс дегидратации (обезвоживания) фрагмента ткани и пропитки его парафином или целлоидином. Этот этап обеспечивает уплотнение ткани, которое, в свою очередь, необходимо для получения срезов, иначе гидрофобный уплотнитель не сможет проникнуть в ткань и она будет излишне мягкой, вследствие чего, при микротомировании будет «сминаться», образуя складки, разрывы и другие артефакты, делающие ее непригодной к изучению).

Традиционно проводку осуществляли путем последовательного погружения ткани по батарее спиртов от 70 % , 80 % , 96 % , до 100 % этанол – по 24 часа в каждом спирте, так как парафин не растворим и в этаноле, образцы выдерживают потом в смеси этанол-ксилол и в чистом ксилоле, 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);
- нестабильное качество получаемой ткани, зависящее от человеческого фактора, от действий лаборанта.

Для решения проблем такого рода лаборатории используют альтернативные реагенты: *изопропанол*, являющийся нетоксичным, а также аппараты *гистопроцессоры*, имеющие закрытый контур и не допускающие испарений в воздух лаборатории. Путем использования гистопроцессоров также можно значительно уменьшить время проводки по сравнению с ручным методом (до одного часа при использовании гистопроцессора Xpress 120) за счет применения вакуум-инфильтрационной и микроволновой методик.

Способы обезвоживания тканей

Существует несколько традиционных способов обезвоживания. Самым распространенным является обезвоживание в спиртах восходящей концентрации, начиная с 70 %-й.

Промывка материала перед проводкой. После фиксации, для которой применялся формалин, кусочки промывают в течение 6, 12 или 24 ч в проточной воде: на водопроводный кран надевают резиновую трубку, конец которой опускают в широкогорлую банку, закрытую марлей. Для промывки удобно использовать эксикаторы разных размеров, снабженные краном: в отверстие крышки эксикатора опускают шланг, по которому подают воду, а через кран эксикатора ее сливают (рис. 128).



Рисунок 128 – Вырезка фиксированного материала

Обычно применяют батарею спиртов, состоящую из двух порций 96 %-го и двух – 100 %-го спирта. Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах в среднем 48 ч в зависимости от качества материала (содержания жира в ткани) и размера кусочков, а также от

их количества. При использовании автомата для заливки количество спиртов увеличивают, а при проведении кусочков по спиртовой батарее вручную их осторожно промокают фильтровальной бумагой или салфеткой из марли, что позволяет реже менять спирты в батарее.

Процесс обезвоживания можно ускорить, периодически встряхивая кусочки в банках со спиртами или поместив их в термостат при 37 °С. Спирты в батарее необходимо своевременно заменять.

Контролировать пригодность спирта позволяет проба с водой. В отлитое из банки небольшое количество спирта добавляют 1 каплю воды. Помутнение раствора свидетельствует о необходимости замены спирта в батарее.

С целью ускорения обезвоживания применяют ацетон без примесей (ЧДА), предварительно добавив в него силикагель для удаления остатков воды или дистиллированный ацетон. Обезвоживание проводят в 2–3 сменах ацетона от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины объектов.

Обезвоживание тканей возможно с помощью 99 %-го *изопропилового спирта*, который непосредственно смешивают с парафином без промежуточных растворителей (ксилол, хлороформ и др.).

Таким же свойством обладает *диоксан*, однако в связи с высокой токсичностью он не нашел широкого применения в патогистологической технике

Для обезвоживания глицерином кусочки ткани последовательно помещают в 60 %-й, 80 %-й и 100 %-й глицерин на 3–4 ч, а затем в смесь, состоящую из равных частей 100 %-го глицерина и ксилола.

В том случае, если в состав фиксатора входила пикриновая кислота, материал следует промыть в нескольких сменах 70 %-го спирта, после фиксации с использованием сулемы – в йодированном 70 %-м спирте.

Выраженное влияние на скорость обезвоживания оказывает микроволновое излучение. Объекты в 70 %-м спирте помещают на 20 с в микроволновую печь (2,5 Гц/500 В), а затем дообезвоживают в абсолютном спирте в течение 30–60 мин.

Секционный и биопсийный материал часто обезвоживают в аппаратах типа АТ-5 и др. с последующим пропитыванием толуолом, хлороформом или их смесью с парафином. При этом применяют две порции 96 %-го спирта и две 100 %-го. Общая продолжительность обезвоживания – 48 ч.

Преимущество использования аппаратов состоит в том, что в них материал постоянно перемешивается и находится во взвешенном состоянии. Однако аппарат не включается автоматически после внезапного перепада напряжения в электрической сети, что может привести к пересушиванию большого количества материала.

В случае необходимости кусочки тканей перед обезвоживанием можно уменьшить, подровнять. Если материал после фиксации не сразу подлежит проводке, то его можно оставить в 70–80 %-м спирте.

Заливка (уплотнение) материала и изготовление срезов

Наиболее удобным способом, обеспечивающим быстрое изготовление срезов, является замораживание кусочка ткани. Однако при этом трудно получить достаточно тонкие срезы. Метод замораживания нельзя применять при работе с очень мелкими объектами; срезы некоторых тканей и органов крошатся и при оттаивании распадаются и т. д. В связи с этим ряд объектов приходится заливать в среды.

Техника заливки материала

Заливка – процесс создания блока, достаточно твердого, чтобы быть пригодным для резки (микротомирования). Выполняется путем заливания фрагмента ткани жидким парафином, целлоидином, пластмассой или специальными средами для заливки. Затем залитую ткань остужают до затвердевания блока.

Из сред для заливки наибольшее распространение получили *парафин и целлоидин*. Фиксированную ткань обезвоживают и пропитывают одним из этих веществ, проводя ее через промежуточный растворитель:

- *ксилол* или *толуол* для парафина;
- *спирт-эфир* – для целлоидина.

Целлоидин в настоящее время практически не используют; чистый парафин также обладает рядом недостатков, делающих его непригодным для исследования – при его затвердевании образуются кристаллы, уменьшающие его объем на 5–10 %, что, в свою очередь, ведет к деформации ткани, кроме того, из-за кристаллической структуры он легко крошится при резке.

Поэтому чаще всего для изготовления блоков используют специальные заливочные среды, представляющие смесь парафинов с

присадками в виде рисового, пчелиного воска или полимеров. Эти присадки придают парафину эластичность, что не дает ему крошиться при резке.

Чтобы создать гомогенную среду для заливки, воск и парафин расплавляют, охлаждают и тщательно перемешивают, повторяя всю процедуру 5–10 раз. Это достаточно трудоемкий процесс, качество получаемой среды нестабильно, поэтому некоторые лаборатории пользуются готовыми средами для заливки, изготовленными в заводских условиях и не требующих дополнительной гомогенизации.

Заливка в парафин

Парафин – смесь высокомолекулярных предельных углеводородов, продукт перегонки нефти; растворяется в анилине, бензоле, бергамотном масле, целлозольве, хлороформе, декалине, диоксане, бутаноле, пропаноле, толуоле, трихлорэтилене, ксилоле. Каждый из этих растворителей можно использовать в качестве промежуточной среды между спиртом и парафином. Температура плавления различных парафинов – от 27 до 62 °С. В гистологической технике применяют парафин с температурой плавления 56 °С. Зарубежные фирмы производят специальный парафин для гистологических исследований, содержащий различные пластические полимеры, такие как диметилсульфоксид. Их коммерческие названия «Парапласт», «Парапласт плюс», «Гистопласт С», «Гистозес».

Важнейшим условием успешной заливки материала является своевременная смена реактивов в процессе их загрязнения, а также соблюдение рекомендуемых временных и температурных параметров. Кроме того, нужно стремиться к тому, чтобы одновременно заливать одинаковые по толщине и плотности кусочки ткани.

Примерная схема заливки в парафин следующая:

- кусочек ткани обезвоживают, проводя через ряд растворов спирта возрастающей крепости – от 40 до 100 %;
- затем помещают в смесь 100 %-го спирта и ксилола (1:1), в ксилол (две порции), в смесь ксилола с парафином (1:1, при t° 37 °С), в чистый парафин (две порции, при t° 55–56 °С);
- парафин быстро охлаждают, кусочек ткани с окружающим его парафином вырезают в виде так называемого блока.

При заливке в парафин и изготовлении блоков можно пользоваться специальными рамками, позволяющими регулировать размер

и форму блоков. Вместо ксилола можно использовать толуол, бензол, хлороформ, а также касторовое масло.

В качестве промежуточной пропитывающей среды часто используют *диоксан*, а для обезвоживания – бутиловый, изобутиловый или пропиловый спирты, амилацетат и т. п.

Заливка в парафин позволяет получить достаточно тонкие, пригодные для световой микроскопии срезы (от 5–8 мкм и до 1–2 мкм).

Приготовление парафиновых блоков

Пропитанные парафином кусочки ткани выкладывают в специальные формочки и заливают расплавленным в термостате или на водяной бане при 60 °С парафином, в который добавлено 1–3 % воска.

Для получения парафиновых блоков нужной формы используют различные приспособления:

- изготавливаемые самим лаборантом бумажные коробочки, на дно которых выкладывают кусочки, а рядом к боковой стенке ставят этикетку номером наружу (рис. 129);

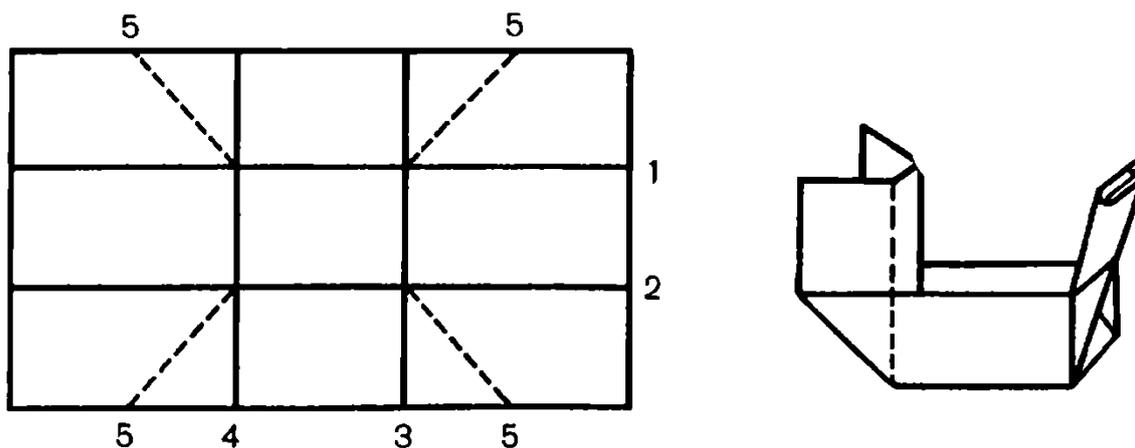


Рисунок 129 – Приспособление для парафиновой заливки

- металлические Г-образные угольники или разъемные формочки, которые перед употреблением смазывают глицерином и помещают на нагретую металлическую пластинку, выполняющую роль дна формочек;

- различные пластмассовые коробочки и формы, в частности, используемые в микробиологии, особенно при заливке мелких объектов, таких как материал пункционных биопсий.

Специальные импортные аппараты для заливки в парафин (так называемые заливочные центры) снабжены набором различных фор-

мочек (кассет) и пинцетов. В них обеспечивается автоматическая подача дробных доз парафина оптимальной температуры.

Раскладывание кусочков в формочки и их ориентирование нужно проводить быстро теплым пинцетом. Если материала для заливки много и он быстро остывает, то можно использовать парафин, подогретый на водяной бане до 60 °С.

Для охлаждения формочки с материалом рекомендуют помещать в воду при 10–18 °С, но не погружать в нее. При застывании парафина поверхность блока стягивается, и в нем образуется кратерообразное углубление. Это нужно учитывать при заливке кусочков и в дальнейшей работе с блоками. Парафин должен на 3–4 мм выступать над поверхностью блока, если предстоит монтировать его на деревянную колодку. Возможны также заливка блока большим количеством парафина и резка без использования деревянных колодок, с успехом применяемая даже на санном микротоме.

В большинстве руководств рекомендуют после подравнивания и удаления лишнего парафина наклеивать блоки на деревянные бруски с помощью подогретого на спиртовке металлического шпателя или скальпеля. Затем для обеспечения более прочного приклеивания основания блок оплавливают с четырех боковых сторон тем же горячим шпателем или скальпелем (рис. 130, 131).

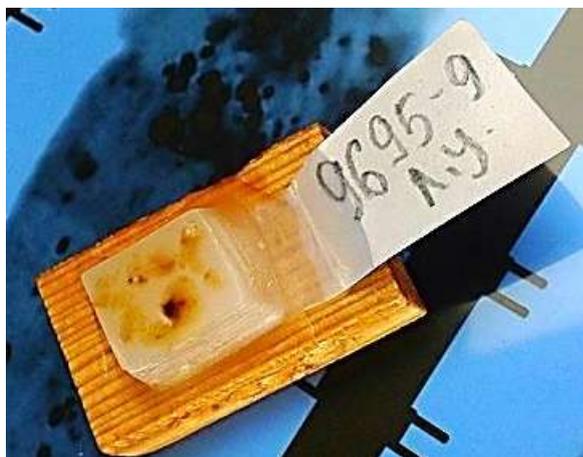


Рисунок 130 – Парафиновый блок, помещенный на деревянную колодку



Рисунок 131 – Хранение парафиновых блоков, без деревянных колодок

Заливка ткани в целлоидин

Целлоидин – хорошо растворяющаяся в эфире нитроклетчатка. В гистологической практике применяют 2 %-й, 4 %-й и 8 %-й растворы

целлоидина, которые готовят из целлоидиновых пластин или отмытой от эмульсии и высушенной рентгеновской пленки.

Для приготовления 500 мл 2 %-го раствора целлоидина 10 г сухого целлоидина заливают 250 мл 100 %-го спирта и оставляют на 1 сутки, затем добавляют 250 мл безводного эфира, который растворяет набухший в спирте целлоидин. Для приготовления 4 %-го и 8 %-го растворов количество целлоидина увеличивают соответственно в 2 и 4 раза. Растворы хранят в плотно закрытой посуде.

Заливка ткани в целлоидин стала в настоящее время менее популярной, чем парафиновая, и ее применяют главным образом:

- для обработки трудно режущихся тканей и объектов больших размеров, с которых трудно получить хорошие парафиновые срезы;
- избежания воздействия на исследуемый материал высоких температур;
- получения лучших результатов при наличии в объектах больших полостей, лакун и слоев различной консистенции.

Эфир и сухой целлоидин огнеопасны, поэтому при работе с ними необходима осторожность.

Схема заливки в целлоидин:

– обезвоженный в спиртах кусочек органа или ткани переносят в смесь 100 %-го спирта и эфира (1:1);

– после чего пропитывают спиртоэфирными растворами целлоидина возрастающей концентрации (от 2 до 8 %);

– затем кусочек в виде блока в деревянных или пластмассовых рамках выдерживают в парах хлороформа до затвердевания целлоидина и помещают в 70 %-й спирт, где препарат приобретает плотность хряща и может храниться долгое время.

Целлоидиновые срезы легко режутся на микротоме и хорошо окрашиваются большинством красителей, однако толщина их больше, чем у парафиновых срезов.

Иногда используют прием дополнительной заливки пропитанных целлоидином кусочков в парафин (заливка в целлоидин-парафин), что позволяет соединить преимущества обоих методов.

Время обезвоживания, пропитывания в промежуточных и заливочных средах подбирают для каждого конкретного исследования. Все более широкое применение находят для заливки тканей *синтетические смолы* (аралдит, эпон и т. д.), особенно при изготовлении срезов для электронной микроскопии.

Приготовление гистологических срезов

Резка, или микротомирование, представляет собой изготовление тонких срезов на специальном приборе – микротоме. Толщина срезов, предназначенных для световой микроскопии, не должна превышать 4–5 мкм, для электронной – 50–60 нм.

Срезы для микроскопического исследования приготавливают с помощью санного или роторного микротомов. Сверхтонкие срезы (толщиной от 90–100 до 5–15 нм), необходимые для электронно-микроскопических исследований, готовят на ультратоме.

Резание парафиновых блоков на санном микротоме

Парафиновый блок, наклеенный на деревянную колодку или без нее (с большим слоем парафина), зажимают в объектодержатель. Установив нужный угол наклона ножа (оптимальный 13–15°) в зависимости от плотности ткани, медленно подводят нож к блоку, регулируют его высоту до соприкосновения с ножом. Сначала выравнивают поверхность блока, установив микрометрическую шкалу на получение толстых (20–25 мкм) срезов, затем шкалу переводят на 6–8 мкм и приступают к резанию материала (рис. 132). Как правило, нож располагается перпендикулярно, но возможно также получение срезов (особенно с более плотных объектов) ножом, который установлен под углом к станине микротоме.

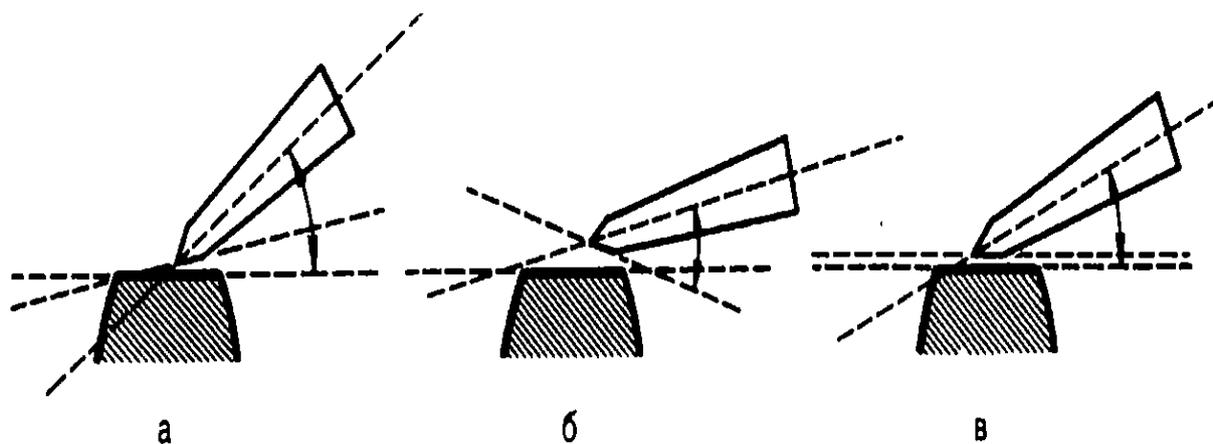


Рисунок 132 – Угол наклона микротомного ножа: а – слишком большой; б – слишком маленький; в – правильный (15°)

Расположение парафинового блока: направление среза

Необходимо помнить, что от расположения парафинового блока зависит направление его разреза, что влияет на визуализацию тех или иных гистологических структур исследуемого участка ткани или органа в готовом гистологическом препарате. На рисунке 133 показаны различные сечения изогнутой трубчатой структуры (например, кишки). Стрелки указывают, как отдельные элементы трехмерного (3D) объекта представлены в двухмерном (2D) изображении на гистологическом препарате.

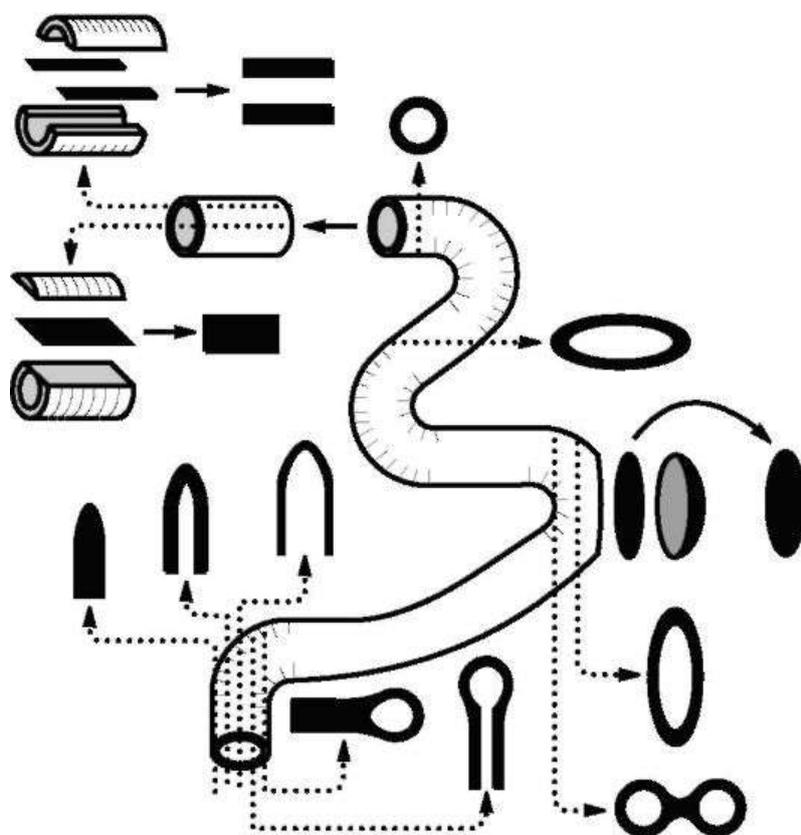


Рисунок 133 – Соотношения между реальными трехмерными структурами и их срезами, дающими двухмерные изображения (кишечник)

Срезы с блока осторожно снимают с помощью сухой или смоченной в спирте кисточки, используют также изогнутую препаровальную иглу или скальпель (рис. 134). При резке надо следить, чтобы волоски от кисточки не попадали под режущий край ножа, так как это приводит к повреждению лезвия. Для ряда исследований необходимо получение серийных срезов.

Срезы обычно переносят в коробку, дно которой выстлано бумагой черного цвета, и укладывают матовой стороной вверх. После по-

лучения нужного количества срезов рядом с ними кладут блок или этикетку с номером. Удобнее сразу обработать 20–30 блоков, а затем приступить к монтированию срезов на предметные стекла.

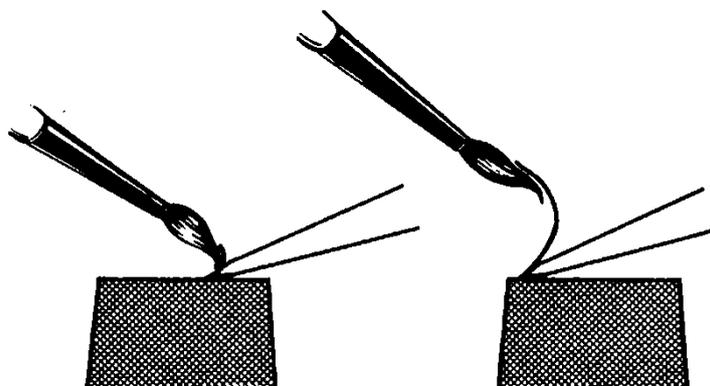


Рисунок 134 – Техника резания парафиновых блоков

Часто срезы наклеивают на предметное стекло непосредственно с ножа. Для этого их переносят в склянку с теплой (35–40 °С) дистиллированной или кипяченой водой, а затем вылавливают на предметные стекла, которые предварительно обезжиривают и натирают белком с глицерином. Срезы приклеивают на предметное стекло блестящей, обращенной к ножу стороной. Небольшие складочки на срезе можно расправить, осторожно дотрагиваясь до них углом согнутой препаровальной иглы.

Можно расправлять срезы непосредственно на стекле с помощью специального приспособления для сушки и расправления парафиновых срезов. Для этого на предметное стекло пипеткой наносят каплю воды и в нее опускают срез. Стекло со срезом помещают на нагреваемый столик прибора, где срез постепенно расправляется. После удаления избытка воды пипеткой или фильтровальной бумагой стекло со срезом подсушивают и одновременно срез плотно фиксируется на предметном стекле. На нагреваемом столике прибора помещается одновременно 45 предметных стекол, при его использовании не требуется дальнейшего просушивания стекол со срезами в термостате. Имеются специальные ванночки для расправления срезов и переноса их на стекло. В них постоянно поддерживается оптимальная температура воды 38 °С.

Продолжительность просушивания срезов в термостате при 37 °С – 6–12 часов. В случае необходимости проведения срочной окраски срезы можно поместить на 10–15 мин в термостат при 56 °С до нача-

ла плавления парафина, что способствует лучшей фиксации среза на предметном стекле. Однако при этом несколько затрудняется депарафинирование: требуется применение дополнительной порции ксилола и увеличение продолжительности депарафинирования.

Существует сухой способ приклеивания срезов к стеклу, который пригоден только для срезов отличного качества. На предметное стекло, смазанное тонким слоем белка с глицерином, помещают срез, аккуратно расправляют его препаровальной иглой или скальпелем и слегка подогревают на спиртовке или нагреваемом столике.

Приготовление целлоидиновых срезов

Для приготовления целлоидиновых срезов используют ножи типа А и Б. Целлоидиновые блоки закрепляют так же, как и парафиновые. После установки ножа в микротом к нему пододвигают объектодержатель с укрепленным в нем блоком. Выравнивают поверхность блока до тех пор, пока полностью не обнажится ткань кусочка, а затем приступают к приготовлению срезов желаемой толщины.

Во время резания нож и объект обильно смачивают 70 %-м или 80 %-м спиртом, пользуясь кисточкой. Нож по салазкам микротома ведут плавно, без давления. Полученный срез расправляют на ноже с помощью кисточки, после чего срез снимают с ножа на подушечку указательного пальца, подложенного под нож. Срезы кладут в склянки с 70 %-м спиртом.

Резание на замораживающем микротоме

Обычно на замораживающем микротоме режут материал, фиксированный в формалине или спирте, а также залитый в желатину. Фиксация в жидкостях, содержащих дихлорид ртути, не рекомендуется, так как наличие ртути ухудшает качество резки (повреждается лезвие ножа).

Прежде чем приступить к подготовке материала для резки на замораживающем микротоме, необходимо проверить, есть ли в баллоне углекислота и поступает ли она в замораживающий столик. Для этого нужно открыть вентиль баллона с углекислотой и повернуть рукоятку, регулирующую подачу газа.

Подлежащий резке фиксированный материал помещают в сосуд с проточной водой и промывают несколько часов (обычно ставят на

ночь). Затем вырезают кусочек толщиной 4–6 мм и кладут в чашку с дистиллированной водой.

Закрепив малый микротомный нож типа С винтами в пазах ножедержателя, устанавливают угол наклона около 45° и отводят в заднее крайнее положение. Затем извлекают подготовленный кусочек материала из воды, кладут на увлажненную поверхность замораживающей камеры или на подкладку из смоченной фильтровальной бумаги и ориентируют в нужном положении. После этого кратковременным открыванием и закрыванием крана подачи углекислоты производят замораживание исследуемого материала. Для ускорения замораживания камеру с препаратом накрывают специальным толстостенным стаканом, входящим в комплект микротома. Если таковой отсутствует, можно приспособить лабораторный стеклянный стакан соответствующих размеров. Одновременно с замораживанием объекта следует производить охлаждение ножа, подавая углекислоту через предназначенную для этого трубку.

По окончании замораживания (о чем узнают по затвердению и побелению препарата) устанавливают микрометрическую шкалу на нужную толщину среза и, поместив нож над объектом, вращением ручки подающего механизма поднимают столик с кусочком ткани до уровня лезвия ножа. Затем движением ножа за рукоятку на себя начинают резку материала. При каждом отведении рукоятки в крайнее заднее положение столик с препаратом автоматически поднимается на заданную высоту. Срез снимают с ножа пальцем или кисточкой и помещают в чашку с дистиллированной водой, где он сразу же расправляется. Если срезы нужно некоторое время сохранить, то после расправления в воде их следует перенести в 10–12 %-й раствор формалина.

Желатиновые блоки режут таким же образом, только охлаждение их более длительное, а примораживание происходит лучше, если накапывать на столик не воду, а раствор желатины, предназначенный для пропитывания объекта. Качество резки также улучшается, если после первого замораживания блоку дать оттаять и затем заморозить его вторично. Собирать срезы следует в холодную воду или 30 %-й спирт, где они легко расправляются. При необходимости хранения срезы переносят в 10 %-й раствор формалина.

Полученные с помощью замораживающего микротома срезы обрабатывают преимущественно свободно-плавающими. Однако при необходимости их можно предварительно наклеить на предметное

стекло. Для этого их помещают в 30 %-й спирт, затем переносят на предметное стекло, смазанное белком с глицерином, расправляют и прижимают гладкой фильтровальной бумагой, смоченной 30 %-м спиртом. После этого срезы переносят в смесь из 50 мл 50 %-го спирта и 7,5 мл формалина (на 1 мин), тщательно промывают дистиллированной водой и окрашивают.

Получение хороших срезов из свежего, нефиксированного материала на обычном замораживающем микротоме затруднено, особенно если дальнейшая обработка не допускает фиксации (например, гистохимическое выявление ферментов).

Последние модели отечественных и зарубежных замораживающих микротомов имеют специальные приспособления для охлаждения ножа. Если микротом старой конструкции, то охладить нож можно с помощью лоточка с сухим льдом.

При резке нефиксированных замороженных блоков охлажденным ножом срезы не сворачиваются и могут быть перенесены холодной кисточкой прямо на предметное стекло, к которому они прилипают и присыхают без клеящих средств.

Как и при заливке в специальные среды, при резке на замораживающем микротоме возможно одновременное приготовление срезов из двух кусочков. Для этого из сравниваемых объектов вырезают кусочки различной формы, располагают рядом на столике, замораживают и режут. Неодинаковая форма срезов позволяет легко различать их. Последующую обработку ведут также одновременно, а после окраски сравниваемые срезы укладывают на одно предметное стекло и приготавливают комбинированный препарат. Однако наилучшие срезы из свежемороженой ткани получают в специальном холодильном аппарате – криостате.

Основные приемы работы с криостатом

Прежде чем брать материал для приготовления свежемороженных срезов в криостате, следует положить в камеру микротомный нож, кисточку, скальпель, препаровальную иглу и подставку для стекол, включить криостат в холодильный агрегат и подождать, пока температура в камере не достигнет рабочего режима ($-12-15$ °С).

Затем материал помещают на снятый с микротомы блокoderжатель, смочив предварительно поверхность водой, ориентируют в

нужном положении и примораживают (можно использовать сухой лед, углекислоту, петролейный эфир, хлорэтил).

Если материал нужно брать срочно и нет времени ждать, пока криостат войдет в рабочий режим, блокодержатель с примороженным объектом следует обернуть холодной фольгой или положить в охлажденный бьюкс для предупреждения вымерзания влаги и поместить в морозильную камеру холодильника (при условии, что температура там не выше $-8-10$ °С). Основное требование – не дать блоку оттаять. Можно хранить замороженные блоки в течение нескольких дней. Перенеся блокодержатель с объектом в холодильную камеру, насаживают его на микротом.

После этого с помощью уже находящегося в камере охлажденного скальпеля придают кусочку необходимую форму, закрепляют в микротоме нож и приступают к резке.

Если степень охлаждения объекта подобрана правильно (для материала различной плотности требуется неодинаковый температурный режим) и противосвертывающее приспособление отрегулировано, то срезы хорошо ложатся на нож.

При скручивании срезов их необходимо расправлять на ноже, для чего, как только нож врежется в блок, следует слегка прижать кисточкой к ножу начало среза и вести нож книзу по мере срезания с блока. Чистое обезжиренное сухое стекло комнатной температуры вносят в камеру и осторожно приближают к срезу. Благодаря разности температур срез отрывается от ножа и прилипает к предметному стеклу.

Стекла со срезами подсушивают при комнатной температуре или же фиксируют в различных жидкостях в зависимости от дальнейшего метода обработки.

При резке в криостате нефиксированных объектов возможно приготовление препаратов, совмещенных из шести и даже восьми кусочков. При этом склеивание и смерзание их настолько тесное, что границу трудно различить даже через микроскоп.

Следует помнить, что для получения хороших срезов кусочек должен быть охлажден до определенного состояния. Если срез крошится, то объект переморожен и нужно немного подождать, пока он, оттаивая, не приобретет надлежащей твердости. Если же срез мнется, то объект недостаточно охлажден и его нужно слегка подморозить.

Возможные погрешности при изготовлении парафиновых срезов

Для того чтобы получить хорошие гистологические срезы, необходимо уметь своевременно распознать и устранить причину, ухудшающую качество срезов.

Срез крошится.

Причины:

- 1) твердый парафин;
- 2) низкая температура окружающей среды;
- 3) медленное охлаждение парафина при заливке;
- 4) большой угол наклона ножа.

Устранение:

- 1) перезалить материал в более мягкий парафин после предварительного растапливания блока в термостате;
- 2) дышать на поверхность блока (согревание) перед каждым движением ножа или приспособить над блоком электрическую лампочку;
- 3) изменить угол наклона ножа.

Залитый материал в процессе резки выпадает из окружающей массы парафина.

Причины:

- 1) при переносе кусочка в формочку для заливки произошло его охлаждение;
- 2) заливка произведена охлажденным парафином;
- 3) недостаточное удаление спирта перед пропитыванием.

Устранение:

В первом и втором случаях необходимо блок растопить в термостате и залить заново, строго соблюдая правила заливки, в третьем случае после предварительного растапливания материал переносят в промежуточные среды (для удаления спирта), затем вновь пропитывают и заливают.

Плоскость среза неровная, материал плохо режется или совсем не режется, нож подскакивает над поверхностью блока.

Причина – переуплотнение материала при проводке и фиксации.

Устранение невозможно. Можно лишь несколько размягчить материал, если на поверхность резания перед каждым движением ножа наносить кисточкой слой горячего парафина (дав ему затем остыть) или дышать на поверхность блока.

Срезы закручиваются, прилипают к поверхности ножа, мнутся.

Причины:

- 1) малый угол наклона ножа;
- 2) мягкий парафин;
- 3) высокая температура окружающей среды.

Устранение:

- 1) изменить угол наклона;
- 2) и 3) перезалить материал в более твердый парафин или охладить блок путем помещения перед резкой в холодильник (можно также положить на поверхность резания кусочек льда).

Приклеивание, сморщивание или разрыв срезов, особенно при резке органов, богатых костной, хрящевой или плотной соединительной тканью.

Причины могут быть следствием их электризации.

Устранение: помещать на лезвие (в месте прохождения среза) каплю воды, дышать на лезвие и блок, натирать участок лезвия и прилежащую часть ножа куском твердого парафина.

Срезы разрываются или покрыты бороздами.

Причины:

- 1) зазубрины на лезвии ножа;
- 2) грязный парафин (плотные соринки царапают срез и портят лезвие);
- 3) материал плохо декальцинирован.

Устранение:

- 1) точка и правка ножа или перемещение в ножедержателе;
- 2) перезаливка в чистый парафин;
- 3) устранить нельзя.

Плоскость среза не однородна (беловатая в средней части).

Причина: недостаточное обезвоживание.

Устранение: расплавление блока и проведение материала через промежуточные среды до абсолютного спирта. После обезвоживания проводят через промежуточную среду, пропитывают и заливают.

Подготовка срезов для дальнейшей обработки

Изготовленные срезы для дальнейшей обработки обычно наклеивают на предметные стекла. Замороженные и целлоидиновые срезы можно не наклеивать на предметные стекла, а переносить из одного раствора в другой с помощью *препаровальной иглы* и т. п.

Последовательность наклейки парафиновых срезов на предметные стекла:

– перед наклейкой парафиновых срезов на обезжиренные, чисто вымытые предметные стекла наносят тонкий слой смеси глицерина с куриным белком (1:1) и нагревают для денатурации белка;

– затем в капле дистиллированной воды на предметном стекле расправляют парафиновые срезы, слегка их подогревая. Избыток воды удаляют и стекла со срезами высушивают при t° 37–40 $^{\circ}$ C в термостате.

Подготовка предметных стекол

Предметные стекла, применяемые для получения гистологических препаратов, необходимо предварительно подготовить. Исключение составляют готовые к использованию и специально упакованные импортные предметные стекла.

Предметные стекла моют в теплой мыльной воде или кипятят в 2–3 %-м растворе гидрокарбоната натрия, затем ополаскивают горячей водой и промывают в течение нескольких часов в проточной воде.

Вымытые стекла протирают чистой хлопчатобумажной тканью и на несколько дней помещают в смесь Никифорова: 96 %-й спирт и эфир (1:1). Обезжиренные стекла извлекают пинцетом из этой смеси, протирают чистой тканью и складывают в коробочку.

Для обезжиривания предметных стекол используют также хромовую смесь, в состав которой входят 100 г бихромата калия, концентрированной серной кислоты и 1000 мл горячей воды. Бихромат калия растворяют сначала в горячей воде, затем раствор охлаждают и после этого по стеклянной палочке осторожно по каплям добавляют серную кислоту. Стекла выдерживают в хромовой смеси 2–3 дня, а затем тщательно промывают в проточной воде в течение 1–2 дней.

Предметные стекла также хорошо обезжириваются в крепком растворе соляной кислоты. Через несколько суток их промывают проточной водой и высушивают.

Качество обезжиривания можно проверить, капнув на предметное стекло воду из пипетки: по обезжиренному стеклу вода растекается тонким слоем, а не собирается в каплю.

Для лучшей фиксации срезов на стекле его предварительно смазывают смесью белка с глицерином. Свежий яичный белок взбивают и фильтруют через крупнопористый фильтр, смоченный дистиллированной водой, затем размешивают с равным объемом глицерина и добавляют несколько кристаллов тимола. Смесь хранится в течение

нескольких месяцев. Применяют также смесь, в состав которой входят 15 мл сыворотки крови, 5 мл дистиллированной воды и 6 мл 5 %-го формалина. После фильтрации смесь готова к нанесению на предметные стекла. Ее использование дает лучшие результаты, чем применение яичного белка, так как при окрашивании не образуется фон.

Разработан способ фиксации среза к предметному стеклу без предварительного натирания последнего белком с глицерином. В ванночку с теплой дистиллированной водой капают несколько капель жидкого казеинового клея и перемешивают. В полученную мутноватую жидкость опускают срезы, расправляют препаровальной иглой и вылавливают на чистое обезжиренное стекло. Этот способ дает неизменно хороший эффект и вокруг среза отсутствует окрашенный фон, как это часто бывает при применении белка (рис. 135).

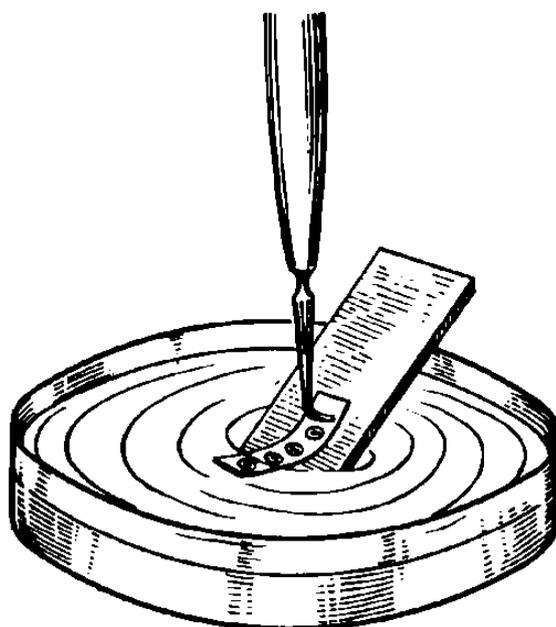


Рисунок 135 – Натягивание находящихся на воде парафиновых срезов на предметное стекло

Очень важно не перепутать очередность серийных срезов при наклеивании на предметное стекло. Для этого ленту срезов разрезают скальпелем на отдельные фрагменты длиной около $\frac{3}{4}$ предметного стекла и укладывают всегда в определенном порядке вдоль или поперек стекла (рис. 136). В зависимости от величины объекта и размера предметного стекла на одном стекле можно разместить различное количество срезов (от 2–4 до 25–30).

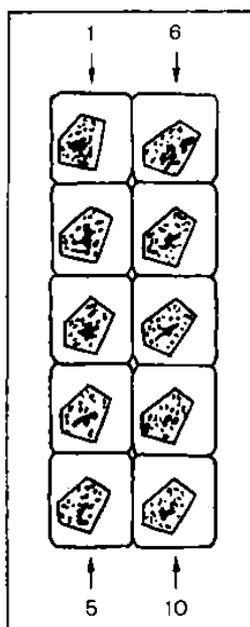


Рисунок 136 – Порядок расположения серийных срезов на стекле

Предварительная подготовка срезов к окрашиванию

Депарафинирование срезов

Парафиновые или целлоидин-парафиновые срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя – бензола, толуола, ксилола, бензина. Особенно тщательно удаляют парафин перед исследованием ткани в поляризационном микроскопе, так как парафин обладает двоякопреломляющим свойством.

Перед окраской или исследованием препаратов в неокрашенном виде из срезов удаляют парафин путем последовательного помещения препаратов в растворы ксилола и спиртов понижающейся концентрации (от 100 до 40 %). Депарафинирование осуществляют по следующей схеме (табл. 2):

Таблица 2 – Схема депарафинирования срезов

| Раствор для депарафинации | Техника депарафинации |
|---------------------------|--|
| Ксилол I | 10–15 мин (можно в термостате при 37° С) |
| Ксилол II | 3–5 мин |
| Спирт 100 % I | 1–2 мин |
| Спирт 100 % II | Ополоснуть |
| Спирт 96 % I | Ополоснуть |
| Спирт 96% II | Ополоснуть |
| Дистиллированная вода | 2 смены |

После депарафинирования 100–150 препаратов реактивы необходимо менять. Депарафинированные препараты готовы к окрашиванию сразу после промывания в дистиллированной воде, но во избежание отклеивания срезов, особенно при окраске по Ван-Гизону, их лучше подсушить на воздухе. Если окрашивание производят не сразу, то депарафинированные и высушенные препараты аккуратно, чтобы не повредить срезы, складывают в коробки и окрашивают по мере необходимости.

При использовании целлоидиновых срезов, как правило, не требуется специальных процедур удаления целлоидина – срезы проводят, минуя ксилол, через ряд спиртов понижающейся концентрации (вплоть до воды) и окрашивают.

Окрашивание фиксированных гистологических (цитологических) объектов

Гистологическая окраска – сложный процесс, в котором играют роль многие физико-химических факторы, связанные со свойствами как красителя, так и окрашиваемого объекта. Окрашивание фиксированных гистологических (цитологических) структур клеток и тканей, по-разному воспринимающих те или иные красители в зависимости от физико-химических свойств.

Окрашивание срезов позволяет выявить структуру ткани за счет неодинакового химического сродства различных элементов ткани к гистологическим красителям. Например, окраска гематоксилином и эозином позволяет выявить кислые структуры ткани (ДНК и РНК) за счет их связывания с гематоксилином, имеющим щелочную реакцию, и цитоплазму клеток, которая связывается с эозином.

Перед окрашиванием выполняют монтирование среза на предметное стекло. Для избежания формирования складок срез после микротомирования помещают на поверхность подогретой воды, где он расправляется, а потом уже на стекло. Окрашивание, как и все остальные стадии процесса изготовления гистологического препарата, может выполняться вручную и автоматически.

Различают *традиционное* окрашивание и *иммуногистохимическое*.

Результаты окраски в значительной степени зависят от предшествующей обработки объекта (фиксации, заливки и т. п.).

Гистологические красители

Способы (механизмы) окрашивания гистологических структур

Способы (механизмы) окрашивания гистологических структур многообразны. Существующие теории – химическая, электроколлоидальная, физико-химическая, обменной адсорбции – касаются какого-то одного из механизмов окрашивания, но не охватывают всего многообразия связывания красителей со структурами клеток и тканей.

Гистологические красители классифицируют следующим образом:

- *по источникам получения*: на натуральные и синтетические;
- *по химическому строению*: азокрасители, хинонимидные и т. д.;
- *по способу использования*: протравные (гематоксилин, кармин, сафранин) и т. п.;
- *по возможности избирательно окрашивать объект*: ядерные, цитоплазматические и т. п.
- *по другим свойствам*.

По наиболее распространенной классификации красители подразделяют на следующие группы:

- *основные*;
- *кислые*;
- *нейтральные*;
- *индифферентные*.

Основные красители представляют собой красящие основания или чаще их соли: метиленовый синий, толуидиновый синий, азуры, тионин, а также гематоксилин, бисмарк коричневый и др. Окрашиваемые ими структуры называют базофильными – это структуры, богатые нуклеиновыми или иными кислотами: ядра, рибосомы, аморфный компонент межклеточного вещества. Интенсивность базофильной окраски зависит от числа кислотных групп, способных реагировать с красителем.

Кислые (кислотные) красители – это красящие кислоты или их соли: пикриновая кислота, эозин, эритрозин, конгорот, лихтгрюн, оранж и т. д. Окрашиваемые ими структуры называют *ацидофильными*, а также *оксифильными* или *эозинофильными* – белковые компоненты цитоплазмы и неклеточные структуры (коллагеновые волокна).

Красящие свойства *индифферентных красителей* связаны также с их способностью растворяться в определенных веществах. Так, Судан III или Шарлах-рот, Судан IV хорошо растворяются только в жи-

рах и вследствие этого избирательно окрашивают их в красно-оранжевый цвет.

От окраски в собственном смысле слова отличают *импрегнацию* – специальный метод выявления структур клеток и тканей, основанный на различной их способности удерживать или восстанавливать соли тяжелых металлов, например, серебра, свинца, осмия, золота.

Метахромазия – свойство клеток и тканей окрашиваться в цветовой тон, отличающийся от цвета самого красителя, а также свойство измененных клеток и тканей окрашиваться в иной цвет по сравнению с нормальными клетками и тканями, (например, структуры окрашиваются синим красителем в красный цвет).

Предполагают, что метахромазия обусловлена полимеризацией молекул красителя под влиянием свободных отрицательных зарядов клеток или ткани. Отмечается при патологии соединительной ткани, опухолевом росте, некробиотических изменениях и в ряде других случаев.

Полихроматофилия – способность клеток и тканей окрашиваться обоими типами красителей как кислыми, так и основными.

Ядерные красители и их приготовление

Окрашивание ядер клеток обусловлено двумя механизмами химического взаимодействия:

- 1) основные красители, например, анилиновые, образуют соли в присутствии ДНК и РНК;
- 2) образуют комплексы с ионами металлов при применении протравы.

В практической работе чаще используют протравные красители. К ним относят *гематоксилин, кармин, сафранин, галлоцианин, ализарин*.

Хорошо окрашивают ядра такие красители, как *янус зеленый, основной коричневый, оксазиновые красители (крезиловый фиолетовый, нильский голубой), тианин, азуры, метиленовый синий, основной фуксин, метиловый зеленый* и др.

Следует упомянуть о хороших результатах окраски ядер соком черники, которая предложена М.Д. Лавдовским еще в 1887 г.

Гематоксилин и способы его приготовления

Гематоксилин имеет растительное происхождение: его получают из эфирного экстракта кампешевого дерева. Гематоксилин хорошо

растворяется в спирте и плохо в воде. Красящими свойствами обладает продукт окисления гематоксилина – гематеин, поэтому краситель становится пригодным только после созревания – окисления, на которое требуется от 10 дней до 2–3 нед. Созревание можно ускорить с помощью солей алюминия, хрома, железа и др.

Гематоксилин Эрлиха:

- гематоксилин кристаллический – 2 г;
- спирт 96 %-й – 100 мл;
- дистиллированная вода – 100 мл;
- глицерин – 100 мл;
- алюмокалиевые или алюмоаммонийные квасцы – 3 г;
- ледяная уксусная кислота – 10 мл.

Гематоксилин растворяют в спирте, а квасцы – в дистиллированной воде, смешивают оба раствора и затем добавляют остальные компоненты. Раствор периодически перемешивают. Через 10–14 дней он приобретает темно-вишневый цвет, что свидетельствует о готовности красителя. Продолжительность окрашивания гематоксилином Эрлиха – 4–6 мин. Затем следуют промывание в дистиллированной, потом в водопроводной воде, дифференцировка в 1 % солянокислом спирте, восстановление в аммиачной воде и окончательное промывание в дистиллированной воде.

Для приготовления солянокислого спирта к 100 мл 70 %-го спирта добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты; для приготовления аммиачной воды к 50 мл дистиллированной воды добавляют 2 капли крепкого аммиака.

Результат: ядра клеток (оболочка, хроматин) темно-синие, ядерный матрикс бледно-голубой или прозрачный.

Гематоксилин Гарриса (Harris haematoxylin) – один из самых концентрированных растворов, предназначен для быстрого прогрессивного окрашивания тканевого материала.

- Раствор I: гематоксилин кристаллический 5 мг + спирт 96 %-й 50 мл.
- Раствор II: алюмоаммонийные квасцы 100 г + дистиллированная вода 1000 мл.

Смешивают растворы I и II, затем добавляют 60 мл глицерина и 2,5 г оксида ртути (красной или желтой). Раствор нагревают до 100 °С, остужают, фильтруют. Перед использованием к 100 мл раствора добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты. Преимуществами гематок-

силина Гарриса являются быстрота приготовления и четкость окраски ядер.

Продолжительность окрашивания – 3–4 мин. Затем следуют промывание и дифференцировка, восстановление в аммиачной воде и окончательное промывание в дистиллированной воде.

Результат: ядра ярко-синие.

Гематоксилин Маллори (водный)

- Гематоксилин кристаллический – 2,5 г.
- Алюмоаммонийные квасцы – 50 г.
- Дистиллированная вода – 1000 мл.

Раствор выдерживают 10 суток при 25 °С, добавляют 440 мг перманганата калия и 2,5 г тимола. Перемешивают несколько раз, перед окрашиванием фильтруют.

Продолжительность окрашивания – 3–4 мин. Затем следуют те же процедуры, что и при окрашивании гематоксилином других модификаций.

Результат: ядра синие.

Сок черники

Свежие чистые ягоды черники разминают в фарфоровой ступке, смешивают с равным объемом 96 %-го спирта, настаивают 1–2 сут и фильтруют. Перед окрашиванием часть раствора разводят равным количеством 2 %-го водного раствора алюмокалиевых квасцов и добавляют 2–3 кристаллика тимола.

Продолжительность окрашивания – 5–7 мин. Затем следуют промывание в дистиллированной воде, дифференцировка в солянокислом спирте, промывание в дистиллированной воде, обезвоживание, просветление и заключение.

Результат: ядра темно-фиолетовые.

Цитоплазматические красители

Окрашивание цитоплазмы клеток происходит в результате связывания оснований и белков кислотными красителями.

В группу диффузных (кислых) красителей входят карбоновые и сульфоновые кислоты, нитро-, азокрасители и др.

В гистологической практике постоянно применяют: эозины, пикриновую кислоту, оранжевый Г, кислый фуксин, конго красный (конгорот), азокармин, эритрозин.

Чаще используют 1 %-е водные растворы этих красителей, но можно применять и 1 %-й спиртовой раствор. Продолжительность окрашивания колеблется от 5 с до 3–5 мин в зависимости от сорта и серии красителя. Если препарат переокрашивается, то излишек краски легко удаляется при ополаскивании в дистиллированной воде и последующем обезвоживании препарата или среза в спиртах.

К *нейтральным красителям* относят смеси, содержащие как основные, так и кислые красящие компоненты, например, смесь Романовского-Гимзы, Азур 2-Эозин и др.

Окраска гематоксилином и эозином

Самый распространенный метод окраски. Сочетает основной и кислый красители. Поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие внеклеточные структуры. Ядра приобретают синевioletовый цвет, цитоплазма – желтовато-розовый.

Замечание: используемый гематоксилин готовится по методу Эрлиха – окисляется до гематина калийными квасцами.

Гематоксилин (натуральный черный №1) – добывается из древесины кампешевого дерева (лат. *Haematoxylum campechianum*) (рис. 137). Свежесрубленная древесина кампешевого дерева имеет кроваво-красный цвет (откуда и происходит латинское название дерева – *Haematoxylum*), от окисления пигмента на воздухе древесина принимает сначала темно-фиолетовый, а затем темно-синеватый и почти черный цвет (рис. 138).

Из сока коры получают при содействии солей окиси железа черно-фиолетовые китайские чернила.



Рисунок 137 – Кампешевое дерево



Рисунок 138 – Гистологическая краска Гематоксилин (натуральный черный №1)

Природа окраски связана с химическим связыванием гемалюма (комплекса, образованного ионами алюминия и гематеина – продукта окисления гематоксилина). Этот комплекс «краска-металл» окрашивает клеточные ядра (а точнее ДНК и РНК, содержащиеся в ядрах) и некоторые другие образования (кератогиалиновые гранулы и кальцифицированный материал) в насыщенно синий цвет (рис. 139).

После того как окрашены ядра, необходима контрокраска, для которой применяют раствор эозина.

Эозин – синтетический краситель интенсивно-розового цвета, окрашивающий прочие клеточные детали и межклеточное вещество в различные оттенки красного розового и оранжевого (рис. 140).

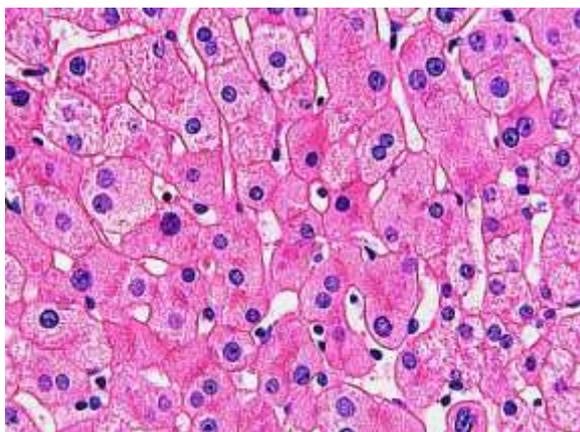
Техника окрашивания

Подготовка срезов к окраске заключается в их кратковременной обработке спиртом. Поскольку при заливке в парафин или целлоидин материал обезвоживается в спиртах, срезы, полученные при этих способах заливки, в особой подготовке для окраски гематоксилин-эозином не нуждаются. Обрабатывать необходимо замороженные срезы. При этом происходит их обезжиривание и другие изменения в структуре, что значительно улучшает окрашивание гематоксилин-эозином. Срезы обрабатывают в 96 %-м спирте не более 3–5 минут. Из спирта срезы переносят обратно в дистиллированную воду. Окраску производят сначала гематоксилином, затем эозином (табл. 3).

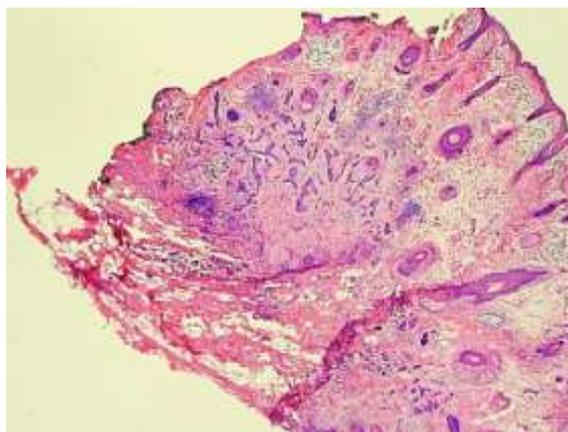
Таблица 3 – Порядок проведения окраски

| Компонент для окрашивания | Временная экспозиция воздействия на препарат |
|---|--|
| Дистиллированная вода | Ополоснуть |
| Раствор гематоксилина | 1–20 мин |
| Солянокислый спирт | Дифференцировка |
| Аммиачная вода | Срезы синеют (контроль под микроскопом) |
| Проточная вода | 5–10 мин |
| Дистиллированная вода | Ополоснуть |
| Раствор эозина | 10 с – 3 мин |
| Спирт 96 %-й, карбол-ксилол, заключение | |

Результат: ядра – синие (фиолетовые), цитоплазма и межклеточное вещество – розовые.



*Рисунок 139 – Клетки печени
(окраска гематоксилином Эрлиха
и эозином)*



*Рисунок 140 – Фрагмент кожных
покровов и подкожной клетчатки
(окраска гематоксилином Эрлиха
и эозином)*

Окрашивание железным гематоксилином по Гейденгайну – при окрашивании используется любая фиксация, но наилучшие результаты после получают при применении сулемовых и хромовых фиксаторов.

Железный гематоксалин в отличие от приведенных выше гематоксилиновых растворов окрашивает не только ядра, но и различные цитоплазматические и некоторые межклеточные структуры (рис. 141). Это свойство основано на том, что перед окрашиванием препарат протравливают в растворе железоаммониевых квасцов, которые по-разному воспринимаются различными тканевыми элементами. Последующая обработка протравленных тканей гематоксилиновым раствором приводит к образованию черного железно-гематеинового лака, который в процессе дифференцировки срезов частично уходит из тканей обратно в раствор. Таким образом, по типу окрашивания железный гематоксалин – типичный регрессивный краситель. То есть, варьируя время протравливания, окрашивания и дифференцировки, можно получать различный конечный эффект в зависимости от целей исследования (выявить только ядерные структуры или одновременно цитоплазматические и внеклеточные образования).

Приготовление растворов

- *Раствор железоаммониевых квасцов.* Растворить 10 г железоаммониевых квасцов (сульфат аммиака-железа) в 100 мл дистиллированной воды. Можно употреблять только светло-фиолетовые кристаллы. Желтые, зеленоватые, беловатые кристаллы применять не следует.

• *Раствор гематоксилина.* Растворить 1 г гематоксилина в 10 мл 96 %-го спирта и разбавить дистиллированной водой до 100 мл, отметив уровень жидкости в сосуде, затем оставить для «созревания» на 4–5 нед, обеспечив постоянный доступ света и воздуха (для этого горлышко сосуда надо прикрыть сложенной в несколько слоев марлей и по мере испарения доливать воду до исходного уровня).

В процессе созревания раствор меняет светло-коричневую окраску на темно-коричневую. Перед употреблением раствор разбавляют равным количеством дистиллированной воды.

Если необходимо обеспечить быстрое приготовление раствора гематоксилина (без созревания), то к раствору, приготовленному по описанному выше рецепту, добавляют 0,1 г йодата натрия (NaIO_3), который быстро окисляет гематоксин в гематеин и делает краситель пригодным к употреблению через 1 час после приготовления.



Рисунок 141 – Скелетная поперечнополосатая мышечная ткань: продольный срез (окраска железным гематоксилином)

Выявление внеклеточных структур соединительной ткани

Выявление аргирофильных (ретикулиновых) волокон (фиксация – 15 %-й формалин)

Ретикулиновые волокна импрегнируют серебром (само название «аргирофильные» говорит о сродстве этих волокон к солям серебра). После серебрения ретикулиновые волокна приобретают черный или коричнево-черный цвет.

Для успеха импрегнации при всех способах серебрения срезов необходимо точно соблюдать прописи, а также чистоту реактивов и посуды. Необходимо иметь отдельную стеклянную посуду для импрегнации. Каждый стаканчик или пипетку надо использовать только для одних и тех же растворов. Металлические приборы при серебрении употреблять нельзя.

Перед работой посуду тщательно обрабатывают смесью бихромата калия с серной кислотой, промывают в проточной воде в течение 1 ч и ополаскивают дистиллированной водой. После работы посуду также тщательно моют и ополаскивают дистиллированной водой. Особенно внимательно следует обращаться со стеклянной палочкой для переноса срезов, если для каждого раствора нет специальной палочки. Хранить такую палочку надо в дистиллированной воде и перед употреблением вытирать и ополаскивать чистой дистиллированной водой. Кристаллический нитрат серебра должен быть совершенно белым (серебро розового, серого и черного цвета непригодно к употреблению).

Для приготовления растворов всегда пользуются свежей дистиллированной водой.

Рабочие растворы:

- *раствор аммиака серебра.* К находящимся в посуде с притертой пробкой 10 мл 10 %-го раствора нитрата серебра прибавляют 2 мл 10 %-го гидроксида калия. В результате образуется темно-бурый осадок гидрата оксида серебра. Затем к этой смеси, одновременно взбалтывая, добавляют по каплям концентрированный раствор аммиака до тех пор, пока не исчезнет осадок. Затем добавлением дистиллированной воды объем раствора удваивают, фильтруют.

- *раствор перманганата калия 1 %-й;*
- *раствор метабисульфита калия 2–3 %-й;*
- *раствор железоммониевых квасцов 2% (пригодны только прозрачные лиловые кристаллы);*

- *кроме того, необходимо иметь 10 %-й раствор формалина, 0,1 %-й раствор хлорида золота, 1 %-й раствор тиосульфата натрия;*

Результат: ретикулиновые волокна приобретают интенсивно черный цвет, коллагеновые – коричневый или черный, ядра клеток – коричневый (рис. 142).

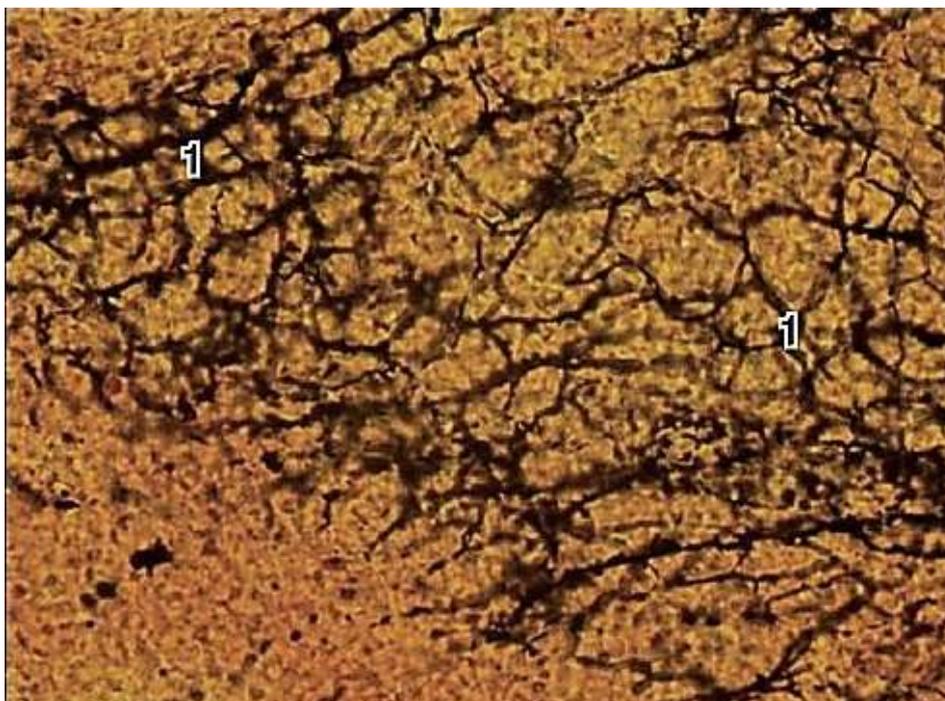


Рисунок 142 – Ретикулярная ткань стромы лимфатического узла: ретикулиновые волокна (1) – окрашиваются в черный цвет (окраска: импрегнация серебром; ×400)

Окрашивание соединительной и мышечной тканей по методу Ван Гизона

Окраска соединительной и мышечной тканей гематоксилин-пикрофуксином по методу Ван-Гизона широко используется в гистологической практике как для получения обзорных препаратов, так и для некоторых специальных целей. В окраске по Ван-Гизону используется смесь пикриновой кислоты и кислого фуксина. Эта окраска – самый простой метод дифференцировать коллагеновые волокна от прочих компонентов соединительной и гладкомышечной ткани.

Метод разработан американским бактериологом Ира Ван-Гизоном (*Ira Thompson Van Gieson*). При использовании этого метода коллагеновые волокна окрашиваются в красный цвет. Клетки гладкомышечной и поперечнополосатой ткани, ороговевающий многослойный плоский эпителий и гиалин – разных оттенков желтого вплоть до коричневатого, а ядра клеток – черными.

Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с окраской гематоксилин-эозином, так как по-разному окрашивает различные ткани. Так, *соединительная ткань* после окраски пикрофуксином имеет ярко-красный цвет, а все *остальные ткани* – буровато-желтый или желто-зеленый.

Метод Ван-Гизона позволяет отдифференцировать гладкомышечные клетки от соединительнотканых в тех случаях, когда их трудно различить на препаратах, окрашенных другими методами. В качестве ядерной окраски применяют железный гематоксилин Вейгерта, дающий черную или буро-черную окраску ядер.

Гематоксилин Вейгерта готовят непосредственно перед окрашиванием, смешивая равные объемы основных растворов Вейгерта (первого и второго), которые хранят отдельно:

- *первый раствор Вейгерта*: в 100 мл 96 %-го спирта растворяют 1 г гематоксилина;

- *второй раствор*: 4 мл 29 %-го раствора хлорида железа (3 +, или 2–3 %-го раствора железоаммониевых квасцов) сливают с 1 мл крепкой хлористоводородной кислоты и добавляют 95 мл дистиллированной воды.

При смешивании растворов приливают второй раствор к первому не в равном, а несколько меньшем количестве, а затем добавляют второй раствор к полученной смеси по каплям из пипетки до равного количества с первым раствором.

В силу изменения поверхностного натяжения раствора он начинает подниматься по стенкам сосуда (бюкса) и собирается в капли, которые вновь стекают в жидкость. Такое явление указывает на правильное количественное соотношение первого и второго растворов Вейгерта в смеси: добавление второго раствора надо прекратить.

Краситель, если он правильно приготовлен – темно-фиолетового цвета. Если он бурого цвета, то имеется избыток второго раствора. Ядра таким красителем будут окрашиваться не в черный, а в бурый цвет.

Растворы Вейгерта в отдельности можно хранить годами, их смесь – не больше 3–4 дней, поэтому лучше всего пользоваться свежим раствором.

Раствор пикрофуксина: к 100 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты прибавляют 5–10 мл 1 %-го водного раствора кислого фуксина.

Если нужно срочно приготовить очень небольшое количество раствора, то в пузырек из-под пенициллина наливают профильтрованный насыщенный раствор пикриновой кислоты (половину пузырька) и к нему по каплям прибавляют 1 %-й раствор кислого фуксина. При этом контролем может служить капля смеси на фильтровальной бумаге, которая должна иметь цвет свежей крови.

Окрашивание:

1. Из дистиллированной воды срезы перенести в гематоксилин Вейгерта на 2–5 минут. Окраску ядер надо контролировать под микроскопом.

2. Ополоснуть срезы в дистиллированной воде и перенести в водопроводную воду на 10 мин (воду нужно сменить).

3. Поместить срезы на 1–3 мин (иногда на 1/2 мин) в пикрофуксин.

4. Быстро (5–10 с) сполоснуть срезы в дистиллированной воде, провести их очень быстро через 96 %-й спирт (можно сменить), просветлить в карбол-толуоле, толуоле и заключить в канадский бальзам.

Результат:

- *коллагеновые волокна* – ярко-красного цвета (рис. 143, 144);
- *мышечные и эластические* – буровато-желтого или желто-зеленого.
- *ядра* – буро-коричневого или буро-черного цвета (рис. 143, 144).

Особенности окраски

Необходим постоянный контроль под микроскопом. Если ядра приобретают бурый, а не черный цвет, то следует дольше подержать срезы в гематоксилине или меньше в пикрофуксине, так как пикрофуксин обладает сильно дифференцирующим действием в отношении гематоксилина.

Существенным недостатком этого метода является *выцветание препаратов*, поэтому их нельзя хранить длительное время. Можно использовать гематоксилин Майера, Карацци, Эрлиха, но гематоксилин Вейгерта дает лучшую окраску.



Рисунок 143 – Сетчатый интрамуральный кардиосклероз (окрашен в ярко-красный цвет) (окраска: по Ван-Гизону; x250)

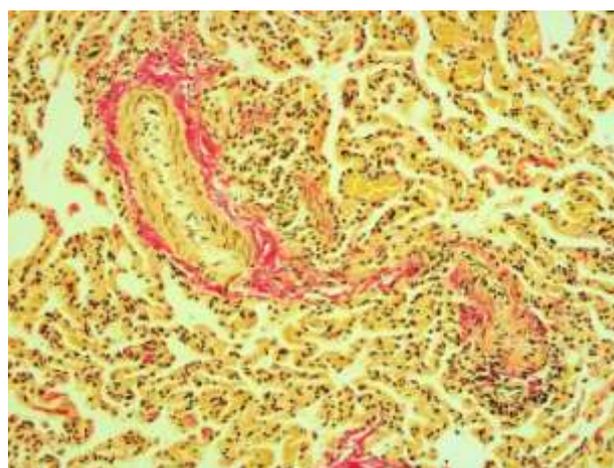


Рисунок 144 – Ткань легкого (окраска: по Ван-Гизону; x250)

Окрашивание гистологических срезов. Общие замечания

Для того чтобы срез, приготовленный одним из указанных выше способов, можно было исследовать с помощью микроскопа, необходимо, чтобы структурные компоненты составляющих его тканей были хорошо различимы в проходящем свете и чтобы срез был защищен от возможного загрязнения и повреждения. Поэтому дальнейшая обработка среза предусматривает его окрашивание, просветление и заключение.

Несмотря на то что окрашивание срезов имеет давнюю историю, до настоящего времени полностью неясен механизм действия многих красителей. Несомненно лишь, что в основе окрашивания тканевых микроструктур лежат физико-химические процессы. Из физических факторов в первую очередь следует отметить явления диффузии (проникновение), адсорбции (поверхностное впитывание) и абсорбции (глубокое пропитывание) красителя, а также его растворимость, из химических – электролитические свойства красящих растворов и самих тканей. Немаловажное значение имеют плотность тканей и дисперсность красителя. Первое свойство определяет последовательность окрашивания отдельных структур, второе – скорость процесса окрашивания.

Именно на электролитических свойствах основано разделение применяемых в гистологической практике красителей на три группы: основные, кислотные и нейтральные.

Основной краситель представляет собой красящее основание или его соль и окрашивает клеточные и тканевые структуры кислой природы, например, хроматин ядра, содержащий ДНК, и ядрышко, содержащее РНК. Отсюда и термин базофилия (любящий основание) для обозначения тканевых компонентов, окрашивающихся основными красителями (тионин, гематоксилин, метиловый зеленый и др.).

Кислотный краситель – это красящая кислота или ее соль, в силу чего он окрашивает вещества и частицы основной природы, например, гранулы эозинофильных лейкоцитов, цитоплазму некоторых клеток передней доли гипофиза и др. Отсюда и термин оксифилия (ацидофильный – любящий кислоту) для тканевых элементов, красящихся кислотными красителями. В эту группу веществ входят эозин, эритрозин, кислотный фуксин, конго красный и др.

Нейтральный краситель образуется при соединении водных растворов кислотного и основного красителей (соединение красящей

кислоты с красящим основанием). К этой группе относят судан, эозиновокислый метиленовый синий и др.

Не следует путать нейтральный краситель с нейтральной красящей смесью, для которой характерно одновременно присутствие в растворе основного и кислотного красителей. Термин нейтрофилия применим к результатам окрашивания обеими группами красителей, так как отражает не свойство красителя, а равновесие между кислотными и основными свойствами окрашиваемых элементов.

Следует помнить, что на качество окраски и ее стойкость значительное влияние могут оказывать способ фиксации, предварительная и последующая обработка препаратов, поэтому нужно строго соблюдать все методические указания и общие правила окрашивания.

Необходимо также подчеркнуть, что большинство гистологических красителей неспецифично, т. е. не раскрывает химическую природу тканевых компонентов. С их помощью можно изучать лишь морфологические особенности микроструктур.

Красители, применяемые для гистологических целей, делят на *природные и искусственные*.

Различают несколько типов гистологического окрашивания: прогрессивный, регрессивный, прямой, непрямой, простой и сложный.

Прогрессивное окрашивание – это такой способ, при котором срезы находятся в красителе до тех пор, пока не достигнут требуемого уровня окрашиваемости.

Регрессивное окрашивание – срезы вначале переокрашивают, а затем доводят до требуемой окраски путем отмыwania в соответствующей жидкости, что позволяет более отчетливо выделить отдельные элементы тканей.

Следует постоянно помнить о следующих правилах:

а) тщательном удалении отмывающей жидкости (в противном случае она будет продолжать действовать и исказит результат окраски);

б) предпочтительном применении тонких срезов;

в) что разведенные красители дают лучшие результаты, чем крепкие растворы (толстые срезы и высокая концентрация красителя затрудняют дифференцировку и приводят к неравномерной окраске срезов);

г) окраску нужно проводить под контролем микроскопа.

Применение регрессивных методов окраски требует определенного навыка, который приобретается постепенно.

Прямое окрашивание – окрашивание объекта непосредственно в растворе красителя, *непрямое (протравная)* – срез окрашивают нужным красителем лишь после предварительной обработки специальными протравными красителями.

При *простом окрашивании* применяют один краситель.

Сложное окрашивание предусматривает обработку препарата несколькими красителями (двумя и более) одновременно или последовательно (окраска гематоксилин-эозином, окрашивание по методу Ван-Гизона).

Все методы гистологического окрашивания можно разделить на две основные группы:

а) *обзорные*, используемые для получения общего ориентировочного представления об изучаемом объекте (окрашиваются преимущественно ядра и цитоплазма клеток);

б) *специальные*, которые позволяют окрашивать именно те тканевые и клеточные элементы, которые интересуют исследователя (органеллы клетки, волокнистые структуры и т. д.).

Методы, составляющие вторую группу, более сложные и требуют особых способов фиксации.

Техника окрашивания

Предварительная подготовка

Перед тем как приступить к окрашиванию срезов, их, как правило, подвергают специальной предварительной обработке, характер которой зависит от методов фиксации материала и приготовления срезов.

Парафиновые срезы требуют наиболее сложной подготовки. Так как парафин не обладает достаточной прозрачностью и затрудняет процесс окрашивания (гистологические красители – это водные или спиртовые растворы, плохо проникающие в парафинированные ткани), его необходимо удалить из среза.

Для этого срез подвергают *депарафинированию* – процессу, обратному тому, который осуществляют при подготовке объекта к заливке в парафин, т. е. срезы последовательно проводят через растворитель парафина, спирты нисходящей концентрации и помещают в воду. Практически это осуществляют так.

Можно одну смену 96 %-го спирта заменить порцией абсолютного спирта, а вместо 70 %-го применить 80 %-й или 60 %-й спирт.

Этикетировывают биологические стаканчики (или высокие бюксы), наливают в них соответствующие растворы и устанавливают в определенной последовательности (рис. 145), обеспечивающей проведение манипуляций по следующей схеме.

В тех случаях, когда материал был фиксирован в жидкостях, содержащих дихлорид ртути, срезы необходимо подвергнуть дополнительной обработке, поместив их после 96 %-го спирта в йодированный спирт. Время пребывания среза в растворе устанавливают опытным путем, наблюдая под микроскопом за растворением осадков дихлорида ртути. Так как йод вредно влияет на многие красители, его удаляют путем последующей обработки срезов (после 70 %-го спирта) 0,25 %-м раствором гипосульфата до исчезновения желтоватой окраски. Затем производят отмывание гипосульфата в дистиллированной воде.

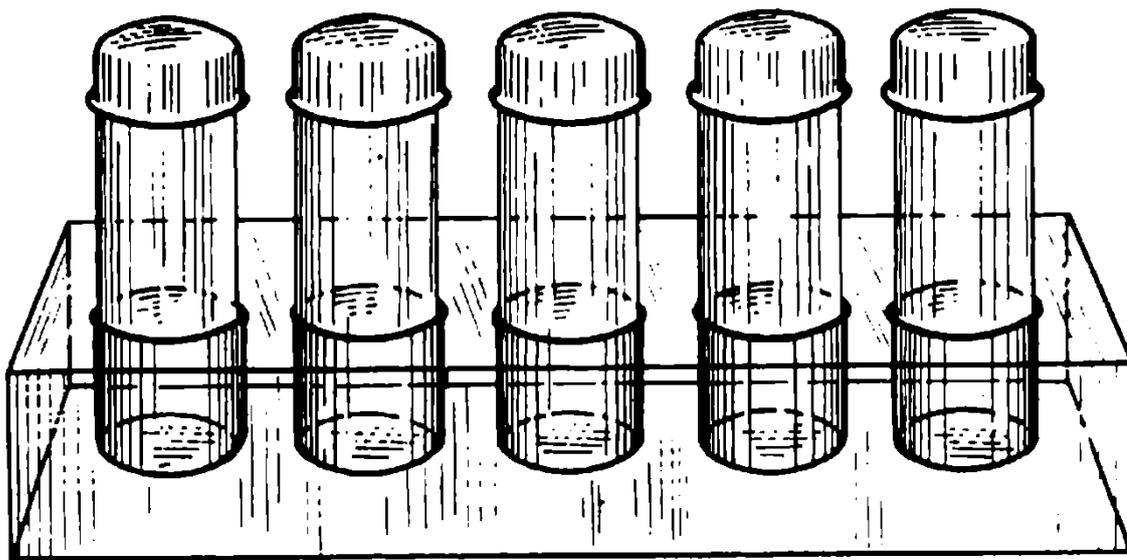


Рисунок 145 – Расположение биологических стаканчиков (батарея) для последовательной обработки наклеенных на стекло срезов (депарафинирование, обезвоживание)

Окраска целлоидиновых срезов

Целлоидиновые срезы можно окрашивать без предварительного удаления целлоидина. В этих случаях срезы из 70 %-го спирта (в котором их хранят или в который собирают в процессе резки) переносят в 50 %-й спирт, а затем в дистиллированную воду. Если применяемый краситель окрашивает целлоидин, то последний удаляют, поместив

срез в один из растворителей целлоидина (смесь из равных количеств абсолютного спирта с эфиром, ацетоном, метиловым спиртом).

После растворения целлоидина срез обрабатывают так же, как при депарафинировании (спирты нисходящей концентрации – вода).

Окраска желатиновых срезов

Желатиновые срезы освобождают от желатина, помещая в слегка подкисленную дистиллированную воду, подогретую до 37 °С. Если блок подвергся дополнительному уплотнению в формалине, то удалить желатин невозможно, и это в ряде случаев может затруднить микрофотографирование.

Окраска замороженных срезов

Замороженные срезы не нуждаются в предварительной обработке, так как обычно при резке их собирают в дистиллированную воду.

Предварительной обработке и последующей окраске можно подвергать как наклеенные на предметные стекла, так и свободноплавающие срезы. В первом случае употребляют биологические стаканчики, специальные кюветы, высокие бюксы. Для того чтобы увеличить пропускную способность, стекла со срезами складывают попарно стороной, не несущей срез (спинкой), друг к другу и располагают в виде треугольника (рис. 146) или (в более просторном сосуде) укладывают пары друг за другом, разделяя их с помощью различных приспособлений (изогнутые стеклянные или металлические пластинки и т. д.).

Для работы со свободноплавающими срезами применяют часовые стекла, низкие бюксы или чашечки. Не наклеенные срезы переносят из одной посуды в другую с помощью стеклянного (или металлического) крючка или шпателя, а стекла – пинцетом. Посуда должна быть четко этикетирована и расставлена в определенном порядке, обеспечивающем нужную последовательность работы.

При переносе срезов из одного раствора в другой необходимо следить за тем, чтобы последующая порция жидкости как можно меньше загрязнялась предыдущей (особенно при перемещении из ксилола в спирт). Для этого при переносе предметных стекол и свободноплавающих срезов стараются обеспечить максимальное стекание жидкости, следя одновременно за тем, чтобы срез не подсох (высыхание заметно по побелению среза). Предметные стекла, сложенные попарно, необходимо разъединить и быстро просушить обратную сторону фильтровальной бумагой или тряпочкой, следя за тем, чтобы не перепутать стороны. Следует также быть внимательным при опус-

кании и извлечении стекол со срезами, ибо при этом можно поцарапать срезы. Необходимо своевременно менять растворы, не допуская их чрезмерного загрязнения.

Если срезы в процессе дальнейшей обработки отклеиваются от стекол (при применении ярко выраженных кислых или щелочных растворов или недостаточно прочном приклеивании), то это можно исправить, применив целлоидиновую защиту. Для этого срез из воды помещают последовательно в 70 %-й и 96 %-й спирт, затем стекло опускают в 0,5–1 %-й раствор целлоидина, вынимают, дают слегка подсохнуть (не до полного высыхания!) и помещают в 70 %-й спирт. В результате этих манипуляций срез и прилежащие участки предметного стекла покрываются тонкой целлоидиновой пленкой, благодаря которой и достигается укрепление среза и на стекле. После этого срез промывают в дистиллированной воде и окрашивают.

Проведение окрашивания

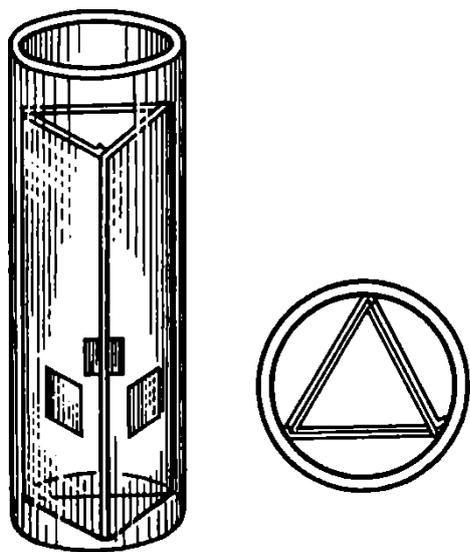
При окраске водными красителями срезы переносят из дистиллированной воды, а при окраске спиртовыми – из спирта соответствующей концентрации непосредственно в красящий раствор (прямое окрашивание) или сначала в жидкость для протравки (непрямое окрашивание).

Когда препарат приобретает нужную интенсивность окраски, его промывают в воде (или спирте) для удаления избытка красителя, а затем, если нужно, дифференцируют в соответствующей жидкости. Излишний краситель отмывают до тех пор, пока он не перестает переходить из среза в отмывающую жидкость.

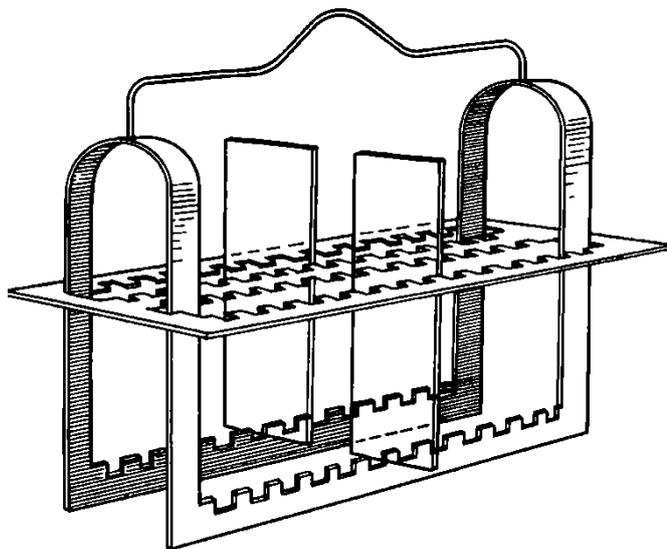
Окрашивание срезов, наклеенных на стекла, можно проводить путем как помещения их в красящий раствор, так и накапывания красителя на срез. В первом случае применяют стеклянные стаканчики, кюветы или специальные металлические стойки, позволяющие одновременно окрашивать большое количество (до 40–50) стекол (рис. 147).

Для окрашивания накапыванием в плоские чашки или ванночки кладут параллельно стеклянные палочки, на которые укладывают предметные стекла. Для того чтобы палочки не смещались, концы их соединяют резиновой трубкой. После этого на срез с помощью пипетки накапывают раствор красителя. Если окрашивание длительное, то во избежание испарения красителя место расположения среза накрывают маленьким часовым стеклом или чашечкой. Подобный эффект можно получить, поместив предметные стекла с накапанным

красителем в чашку Петри, одновременно положив рядом смоченную в воде вату.



*Рисунок 146 – Расположение
стекла со срезом в чашке*



*Рисунок 147 – Приспособление
для одновременной обработки
большого количества стекол со срезом*

После того как чашка будет закрыта, происходит увлажнение воздуха, ведущее к значительному уменьшению испарения красящего раствора. Окрашивание свободноплавающих срезов, как и при предварительной подготовке, ведут в бюксах или на часовых стеклах.

При окраске водными красителями срезы переносят в краситель из дистиллированной воды, а при окраске спиртовыми – из соответствующего раствора спирта. После того как препарат приобретает интенсивную окраску, его промывают в воде или спирте для удаления избытка красителя (дифференцировка), контролируя этот процесс под микроскопом.

Срезы тканей после целлоидиновой и парафиновой заливки, а также полученные на замораживающем микротоме окрашивают в широкогорлых бюксах или на часовых стеклах. Одновременно окрашивают несколько срезов, но промывают, дифференцируют каждый срез отдельно.

Препараты можно помещать в красящий раствор в специальных контейнерах, предназначенных для одновременного окрашивания большого количества стекол. Если препаратов немного, то рациональнее краситель наносить непосредственно на срез по каплям с помощью пипетки.

Остатки красителя можно слить в склянку и использовать повторно. Д. Кисели (1962) предлагал накрывать при этом срезы стеклянным колпаком, а для увлажнения среды оставлять под колпаком смоченную водой вату.

Для того чтобы получить хорошие результаты при любом методе окраски гистологических препаратов, необходимо соблюдать определенные правила:

- красящие растворы должны быть чистыми, поэтому любой краситель необходимо перед употреблением отфильтровать, а водный раствор готовить только на дистиллированной воде;

- отдавать предпочтение:

- а) окрашиванию красителями низкой концентрации в течение длительного времени перед кратковременной окраской красителями высокой концентрации;

- б) применению регрессивных методов;

- тщательно выполнять все процедуры при подготовке среза к окраске и последующей его обработке.

Этикетирование предметных стекол

После наклейки срезов (или непосредственно перед ней) на предметное стекло необходимо нанести соответствующие обозначения. Особенно это важно при серийных срезах и при обработке экспериментального материала. Конкретное содержание пометок зависит от характера исследования и от установок, принятых в той или иной лаборатории.

Наиболее надежный способ – *выцарапывание знаков* специальными карандашами с наконечниками из твердых сплавов типа «победит». Менее надежны надписи тушью. Существуют различные приемы, чтобы тушь при обработке в жидких средах не смывалась и не размазывалась:

- а) до наклеивания срезов один из концов предметного стекла, смазанный белком с глицерином, нагревают над огнем до появления дыма, после охлаждения наносят на данный участок необходимые обозначения и снова прогревают над пламенем;

- б) наносят соответствующую надпись, а затем опускают эту часть стекла в 1–2 %-й раствор целлоидина для образования защитной пленки и т. д.

Заключение препаратов в среды

Изготовление гистологических препаратов обычно заканчивается заключением их в среды, обеспечивающие сохранность структур объекта, его окраски и прозрачности.

Заключение срезов представляет собой помещение окрашенного среза, монтированного на предметном стекле, под покровное стекло с использованием среды для заключения, имеющей коэффициент преломления, близкий к таковому у стекла – с этой целью применяют следующие средства:

- смолы растительного происхождения – бальзамы (канадский, пихтовый и сибирский кедровый);
- полистирол;
- другие специальные среды для заключения.

Все среды хорошо растворяются в толуоле и ксилоле и бензоле.

Смолы растительного происхождения

Различают два вида бальзама – канадский и пихтовый. Канадский бальзам – это смола, добываемая из хвойных пород деревьев: из канадской, или бальзамной пихты (лат. *Abies Balsamea* Miller), растущей в Канаде. Смолу собирают из многочисленных нанесенных на кору дерева серийных параллельных надрезов. Канадский бальзам – бесцветная или слегка желтоватого цвета (очищенный – совершенно прозрачен) жидкость с вязкостью меда, жгучим, горьковатым вкусом, с приятным хвойным запахом. Канадский бальзам обладает индексом приблизительно равным индексу преломления у предметных стекол, используемых при приготовлении гистологических препаратов. Бальзам сохраняет аморфную структуру и не кристаллизуется, когда высыхает, сохраняя свои оптические свойства. Со временем, т. е. с потерей части эфирных масел, входящих в состав смолы, бальзам приобретает желтоватый цвет (рис. 148).



Рисунок 148 – Гистологические препараты, заключенные в канадский бальзам: некоторые, вследствие длительного хранения приобретают желтый цвет

Способ приготовления их одинаков: кусок (или куски) затвердевшей смолы помещают в чистую сухую широкогорлую стеклянную банку и, залив ксилолом (или толуолом), ставят в термостат. Обычно приготавливают раствор жидкой консистенции, который фильтруют и оставляют в открытом сосуде (желательно в вытяжном шкафу). По мере испарения растворителя бальзам начинает загустевать. Когда консистенция его будет напоминать жидкий мед, раствор готов к употреблению.

Обычно бальзам имеет слабокислую реакцию. В тех случаях, когда кислая среда действует на окраску неблагоприятно, необходимо применять нейтральный бальзам, который получают путем добавления небольшого количества порошка карбоната калия или натрия. Хранят бальзам в специальных широкогорлых склянках, закрывающихся притертыми колпачками, шлиф которых смазывают тонким слоем вазелина. Если нет специальной склянки, можно использовать небольшой широкогорлый флакон из-под лекарств, закрывающийся эластичной хлорвиниловой пробкой. В центре пробки делают отверстие и вставляют в него стеклянную палочку, при помощи которой и извлекают бальзам.

Приготовление раствора канадского бальзама

В емкость с сухой смолой заливают толуол, который постепенно растворяет верхние слои смолы. Процесс можно ускорить, если склянку поместить в термостат при 37–40 °С. Полученный густой раствор сливают в другую банку и добавляют новую порцию толуола, одновременно перемешивая раствор и доводя до консистенции жидкого меда. Слишком жидкий раствор по мере испарения толуола вновь загустевает. Приготовленный бальзам хранят в плотно, закрытой посуде (рис. 149, 150).



Рисунок 149 – Канадский бальзам, произведенный в XIX в.

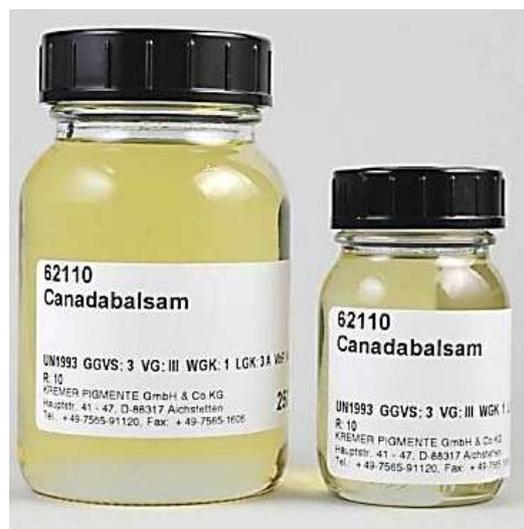


Рисунок 150 – Канадский бальзам, современная упаковка

Синтетические среды

Существует много заменителей канадского бальзама: пихтовый бальзам, даммаровая смола, цедакс, полистирол и т. д. Так, в практической патоморфологии широко используют синтетическую пластмассу – *полистирол*.

Полистирол хорошо растворяется в ксилоле и толуоле, прозрачен и быстро затвердевает под предметным стеклом, образуя тончайшую пленку. Метод растворения тот же, что и для смол растительного происхождения. Однако со временем полистирол становится хрупким, в пленке появляются трещины, что затрудняет микроскопическое исследование и совершенно неприемлемо для микросъемки. Для предотвращения этих недостатков в 30 %-й раствор полистирола в ксилоле добавляют пластификатор, придающий пленке эластичность и гибкость, устраняя все недостатки полистирола. В настоящее время в качестве пластификатора используют *дибутилфталат*, широко применяемый в электронной микроскопии.

Приготовление раствора полистирола

Существует несколько вариантов приготовления полистирола для заключения препаратов:

1) 94 мл 30 %-го раствора полистирола в ксилоле смешивают с 6 мл дибутилфталата;

2) смесь, состоящую из 100 г полистирола, 100 мл ксилола и 12 мл дибутилфталата, растворяют при 22 °С или в термостате при 37 °С, периодически перемешивая.

Готовую синтетическую смолу хранят в плотно закрытой посуде. Технология заключения срезов та же, что и при применении водорастворимых сред.

В случаях, когда препарат нельзя приводить в контакт с ксилолом, спиртом и другими реактивами, растворяющими краситель или окрашиваемое вещество (например, жиры), используют водорастворимые среды (глицерин, желатину или их смеси).

Заключенный в специальную среду препарат можно хранить достаточно длительное количество времени, за исключением полистирола (когда препарат постепенно теряет прозрачность, а сам полистирол трескается). Данные изменения при заключении полистиролом значительно уменьшаются, если в полистирол добавить пластификатор (например, дибутилфталат), при таком условии срок годности гистопрепарата увеличивается до 10 лет даже без покровного стекла, в течение 3 лет изменений практически не происходит.

Техника заключения препаратов в среды

Срезы или наклеенные на стекло препараты тщательно обезвоживают в спиртах (70 %-м, 96 %-м и 100 %-м), а затем помещают в любые из просветляющих веществ.

Установлено, что для разных исследований предпочтительнее то или иное просветляющее вещество. Так, при окраске по Нисслию и методу Грама-Вейгерта лучшим просветляющим и одновременно дифференцирующим средством является анилиновое масло, но для просветления препаратов при окраске по Ван-Гизону его использование недопустимо. Наиболее распространенными и индифферентными по отношению к красителям веществами являются толуол и ксилол, а также их смеси с фенолом (кристаллический фенол расплавляют в термостате при 56 °С и смешивают с ксилолом в пропорции 1:4 или 1:6).

Хорошо обезвоженные в спиртах и просветленные в карбол-ксилоле, а затем в чистом ксилоле препараты готовы к заключению в специальные смолы.

Последовательность заключения препаратов в среды:

– хорошо промытые после окраски или фиксации препараты обезвоживают в спиртах восходящей крепости (до 100 %-го);

– препараты просветляют в смеси кристаллической карболовой кислоты (1 часть) и ксилола (3 части) и помещают в две порции чистого ксилола;

– затем на препарат наносят каплю раствора канадского бальзама (на ксилоле, толуоле или бензоле и др.) и покрывают покровным стеклом. После высыхания растворителя бальзам затвердевает, препарат можно многократно использовать для микроскопирования.

Заключение срезов под покровное стекло

Количество бальзама нужно рассчитывать таким образом, чтобы его хватило только на покрытие всей площади под покровным стеклом. Если бальзама мало, то останется свободное пространство между стеклами, если много, раствор растечется по предметному стеклу и испачкает его (рис. 151).

В первом случае – нужно нанести каплю бальзама на предметное стекло у того края покровного стекла, под которым остался воздух, и он заполнит пустоту. Если бальзам вытек из-под покровного стекла, его нужно тут же стереть тряпочкой, слегка смоченной в ксилоле. Заключенный препарат помещают на специальный планшет и кладут на покровное стекло груз на 24 ч для расправления.

Если нужно сильно прижать (значительная неровность поверхности препарата), то применяют бельевые зажимы. Препарат должен находиться в горизонтальном положении не меньше 24 ч. После того как бальзам загустеет, препарату можно придавать любое положение (рис. 152).

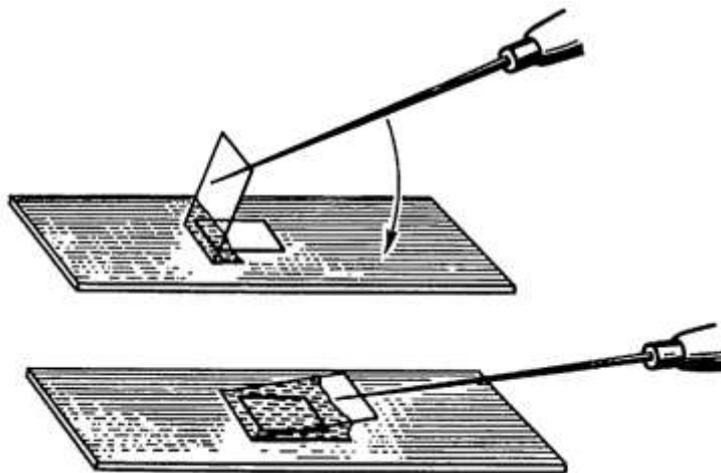


Рисунок 151 – Заключение срезов под покровное стекло



Рисунок 152 – Старинные щипцы для приготовления гистологических препаратов: браниши щипцов прижимали покровное стекло к предметному, удерживая их от смещения до тех пор, пока канадский бальзам не высохнет (середина – конец XIX века, Британская империя)

Заключение в среды, смешивающиеся с водой.

Из этих сред чаще применяют глицерин-желатин. Используют также чистый глицерин, однако этот метод не позволяет готовить постоянные препараты.

Р. Лилли рекомендует для этих целей гумми-сироп Апати:

- чистый гуммиарабик – 50 г;
- сахар-рафинад – 50 г;
- дистиллированная вода – 50 мл.

Смесь растворяют на водяной бане при постоянном помешивании, затем добавляют 500 мг тимола. Используют также поливиниловый спирт.

Среды, смешивающиеся с водой (кроме глицерина), предварительно нагревают на водяной бане, капают нагретой стеклянной палочкой или пипеткой на расправленный срез, слегка подсушивают и покрывают чистым и сухим покровным стеклом. Чистой стеклянной палочкой или обезжиренным пальцем слегка прижимают покровное стекло. При этом излишки среды выдавливают и аккуратно удаляют чистой тканью.

Для длительного хранения препаратов, чтобы избежать их высыхания, многие авторы рекомендуют окантовывать покровное стекло тонким слоем парафина или целлоидина. Однако опыт показывает, что заключенные в глицерин-желатин препараты и без окантовки хорошо сохраняются свыше 10 лет.

Возможные погрешности при заключении в среды:

а) препарат покрыт мельчайшими пылевидными капельками (недостаточное обезвоживание) – необходимо сменить растворы, увеличить время обезвоживания;

б) под стеклом разнокалиберные подвижные пузырьки (при заключении попал воздух) – если пузырьки расположены над препаратом и при легком надавливании препаровальной иглой на покровное стекло не исчезают, необходимо перезаклечь препарат; для этого стекло с препаратом погружают в ксилол и держат до тех пор, пока покровное стекло сползет само или легко поддастся смещению препаровальной иглой (рис. 153);



Рисунок 153 – Артефакты (дефекты) гистологических препаратов, заключенных в полистерол: множественные пузыри воздуха под покровным стеклом

в) препарат пересекают бесструктурные или зубчатые объемные волокна, на срезе расположены различные включения (загрязнение препарата в процессе проведения через растворы, загрязнен бальзам или же плохо очищено покровное стекло) – фильтруют растворы, тщательно протирают покровные стекла.

Хранение гистологических препаратов

Хранить гистологические препараты следует защищенными от пыли и света. Наиболее целесообразный способ – *хранение в специальных коробках с зубчатыми рейками* (рис. 154).

Хранение в папках менее удобно, так как не исключает запыления и требует много места.

Хорошо высушенные препараты можно держать и в обычных картонных коробках (из-под конфет, сигарет и т. д.). В этих случаях стекла складывают попарно спинками и каждую пару отделяют от последующей горизонтальной полоской плотной бумаги.

Необходимые пометки делают на наружной поверхности стенок коробок.



*Рисунок 154 – Ящик для хранения гистологических препаратов
(материал – дерево)*

4.2.4. Приготовление пленчатых препаратов

В тех случаях, когда необходимо изучить микроскопическую структуру объекта, имеющего пленчатое строение (серозные и мозговые оболочки, соединительнотканые мембраны и т. д.), приготоавли-

вают целостные (тотальные) препараты. Для этого иссекают подлежащий исследованию участок пленки и во избежание образования складок перед фиксацией накалывают в расправленном состоянии на восковую (или пробковую) подушку.

По окончании фиксации материал обрабатывают обычным способом: отмывают фиксатор, окрашивают, обезвоживают, просветляют и заключают в соответствующие среды.

4.2.5. Метод изготовления временных препаратов

Преимуществом временных препаратов перед постоянными является быстрота их изготовления и возможность наблюдать живые клетки и ткани.

Временные препараты делают из мазков, соскобов, тонких пленок, расщепленных объектов или путем растягивания стенок полых органов.

Объекты рассматривают в капле воды или физиологического раствора, либо в натуральном виде, либо подкрашивая их слабыми растворами витальных красителей.

4.2.6. Цитологические окраски

Окраска по методу Романовского-Гимзы

Окрашивание по Романовскому-Гимзе – цитологический метод окрашивания микроорганизмов, клеточных структур и тканей различных видов (в том числе крови) для изучения методом световой микроскопии.

Предложена в 1904 году Густавом Гимзой. В авторской версии краситель называется «Giemsasche Lösung für die Romanowsky Färbung» (Раствор Гимзы для окраски по Романовскому) (рис. 155, 156). Окрашивает ацидофильные образования в различные оттенки красного цвета, базофильные – в цвета от пурпурного до синего (рис. 157).

Краситель Романовского-Гимзы состоит из щелочной (азур II) и кислой (эозин) частей. Азур II окрашивает структуры клеток в яркосиний цвет, а эозин в розово-красный. Щелочные части клеток связываются и окрашиваются кислыми красителями, а кислые – щелочными.



Рисунок 155 – Дмитрий Леонидович Романовский (1861–1921) русский врач-терапевт, гематолог, микробиолог и инфекционист



Рисунок 156 – Густав Гимза (1867–1948) немецкий химик и бактериолог. Известен созданием раствора, используемого при окраске по Романовскому-Гимзе

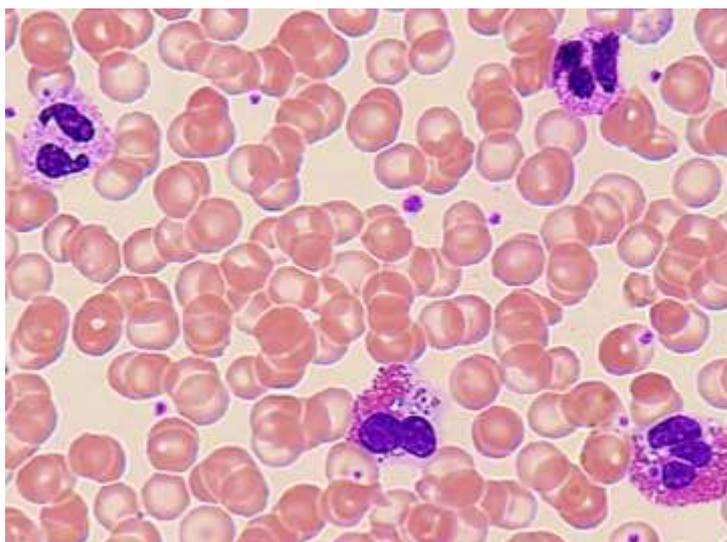


Рисунок 157 – Мазок крови человека: типичная картина (окраска по методу Романовского–Гимзы)

Рабочий раствор красителя получают разведением готового раствора дистиллированной водой (1–2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды). Для хорошего окрашивания мазка имеют значение качество красителя, реакция и температура воды. Очень важно, чтобы дистиллированная вода, в которой растворяют краситель, имела нейтральную реакцию:

– если *реакция кислая*, то слабым действием щелочного элемента красителя белые кровяные элементы окрашиваются плохо, а препарат становится красным;

– если вода имеет щелочную реакцию, то слабеет действие кислого элемента краски, лейкоциты окрашиваются слишком интенсивно и препарат делается синим.

Реакцию воды проверяют посредством гематоксилиновой пробы: в 4–5 мл воды бросают крупинку гематоксилина. Если вода имеет щелочную реакцию, то окрасится ранее 3-й минуты. Если окрашивание наблюдается через 5 мин или не происходит, то вода имеет кислую реакцию. Если вода окрашивается через 1–4 мин в розово-фиолетовый цвет, то она нейтральна и годна к употреблению. При кислой реакции воды в нее прибавляют по каплям 1 %-й раствор карбоната натрия, пока гематоксилиновая проба не станет характерной для нейтральной воды. При щелочной реакции добавляют по каплям 1 %-й раствор уксусной кислоты. Для того чтобы правильно оценить результаты пробы, стаканчик с водой надо ставить на лист белой бумаги.

Техника окраски

Окраску мазков производят по методу Романовского-Гимзы следующим образом:

– рабочий раствор краски готовят непосредственно перед окраской;

– перед окраской нужно предварительно проверить качество красителей, окрасив и просмотрев несколько мазков, для того чтобы установить время, лучшее для окраски;

– приготовленные мазки крови подсушивают, затем фиксируют с помощью метилового спирта (3–5 мин) или абсолютного спирта (100 %-го) (10–15 мин) или ацетона (5 мин). Наилучшие результаты дает фиксация мазков метиловым спиртом. Фиксирующие жидкости денатурируют белки клетки при сохранении их прижизненной структуры, а также закрепляют мазки на стеклах. Нефиксированные мазки легко смываются;

– препарат помещают мазком вниз на 2 стеклянные (деревянные) палочки, положенные на дно чашки Петри. Краску подливают под препарат;

– окрашивают 20 мин. Затем мазок промывают под струей воды, сушат и микроскопируют.

Результаты окрашивания

Бактерии окрашиваются в фиолетово-красный цвет, цитоплазма клеток – в голубой, ядра – в красный. При окрашивании простейших их цитоплазма приобретает голубой цвет, а ядра – красно-фиолетовый (рис. 158, 159).

При окраске мазков крови по методу Романовского-Гимзы эритроциты окрашиваются в бледно-розовый цвет, ядра клеток – в сине-фиолетовый, гранулы эозинофилов – в ярко-красный, базофилов – в синий, цитоплазма лимфоцитов и моноцитов – в голубой цвет.

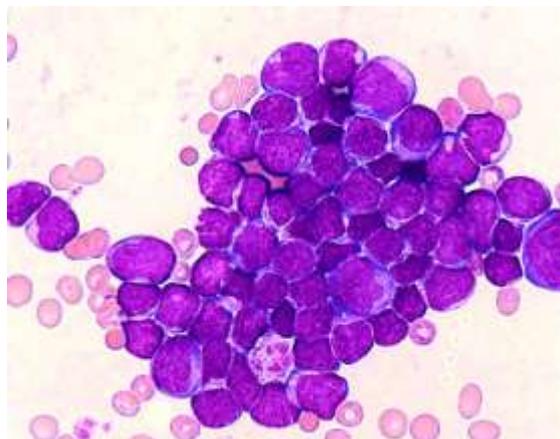


Рисунок 158 – Мазок костного мозга человека: типичная картина (окраска по методу Романовского-Гимзы)

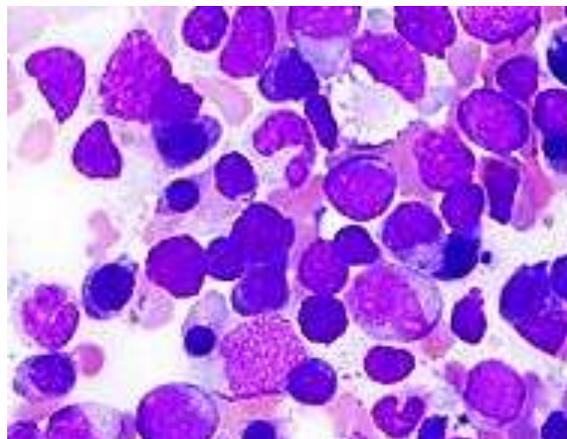


Рисунок 159 – Мазок костного мозга человека, острый миелоидный лейкоз (окраска по методу Романовского-Гимзы)

Окраска толстой капли крови

Толстые капли крови не фиксируют. Предметные стекла с хорошо просушенными толстыми каплями располагают на «рельсах» на некотором расстоянии друг от друга и на 8–10 мин наливают на них рабочий раствор азур-эозина по Нохту. Происходит «выщелачивание» эритроцитов. Затем краску сливают и на препараты наливают новую порцию рабочего раствора азур-эозина по Нохту на 30–35 мин. После этого предметные стекла осторожно ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные этапы изготовления гистологического препарата.
2. Что такое фиксация и в чем ее сущность?
3. Какие наиболее употребляемые в гистологической практике простые и сложные химические фиксаторы вы знаете?
4. Какие плотные среды используют для объектов с целью последующего изготовления гистологических препаратов?

5. Какова последовательность заделки объектов в парафин?
6. Какова последовательность заделки препаратов в целлоидин?
7. Перечислите виды приборов, используемых для изготовления гистологических срезов.
8. Какие гистологические структуры называют оксифильными, базофильными и нейтрофильными?
9. В чем состоит сущность метода автордиографии?
10. В чем состоит сущность метода импрегнации?
11. Назовите фиксаторы, используемые в электронной микроскопии.
12. Какие среды используют для уплотнения в электронной микроскопии?
13. Какие основные компоненты составляют оптическую часть микроскопа?
16. Какие основные компоненты составляют механическую часть микроскопа?
17. Какие основные компоненты составляют осветительную часть микроскопа?
18. Каким образом определяют общее увеличение микроскопа?
19. Каков принцип действия и назначения бинокулярного, фазово-контрастного, поляризационного, темнопольного, ультрафиолетового, люминисцентного и электронного микроскопов?
20. Перечислите основные исторические этапы развития методов гистологического исследования.

ТЕМА 5. ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ. МЕТОД ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ. МЕТОД АВТОРАДИОГРАФИИ

Применение новых методов исследований в гистологии, цитологии и эмбриологии позволяет выяснить общие закономерности организации тканей и клеток, структурные основы биохимических процессов, определяющих функцию конкретных структурных компонентов клетки, а также их изменение в рамках развития патологических процессов.

5.1. Гистохимические методы

Длительное время для изучения химического состава клеток и тканей пользовались исключительно классическими биохимическими методами, в основе которых лежит суммарное определение химических веществ в размельченной ткани (гомогенате). Несмотря на свои положительные качества, эти методы не обеспечивали полного представления о локализации тех или иных химических веществ в различных структурных компонентах клеток и тканей. Поиски методов, с помощью которых можно было бы определять локализацию химических веществ в целостных микроструктурах органов и тканей, привели к созданию гистохимического метода, объединяющего в себе гистологический и биохимический методы.

При *гистохимических реакциях* неорганические и органические вещества, входящие в состав клеток, вступают в химическую реакцию с различными реактивами (красителями) и образуют окрашенные продукты реакции. По степени интенсивности этих продуктов можно до некоторой степени судить и о количественном содержании химического вещества в той или иной структуре. В основе большинства гистохимических реакций лежат общие принципы. Определенные химические группировки окрашиваются тем или иным красителем. Например, фосфатные группы РНК образуют с основными красителями (пиронин, толуидиновый синий и др.) солеобразные окрашенные соединения. Краситель растворяется в определенном субстрате, входящем в состав клеточных структур. Например, окраска жировых включений в клетке основана на растворении Судана в жировой капле (рис. 160, 161).

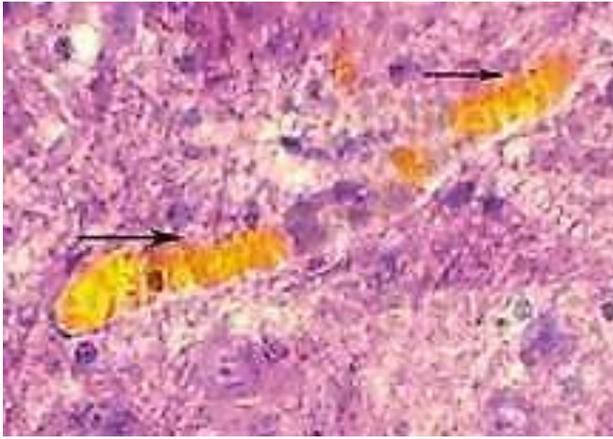


Рисунок 160 – Обтурирующие жировые эмболы в капиллярах ствола головного мозга в виде однородных оранжево-желтых включений (окраска: Судан III; x250)

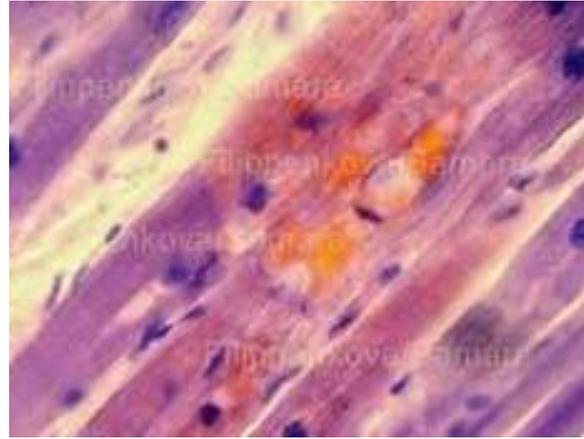


Рисунок 161 – Жировая дистрофия кардиомиоцитов, жировые капли оранжево-желтого цвета, полностью замещающие цитоплазму кардиомиоцитов (окраска: Судан III; x250)

Некоторые химические компоненты клеток (ДНК, полисахариды) неспособны реагировать с красителями. В таких случаях прибегают к превращению их химических группировок в реакционно-активное состояние (гидролиз ДНК хлористоводородной кислотой, окисление полисахаридов йодной кислотой). При этом освобождаются или создаются вновь химические группировки, которые способны реагировать с соответствующими реактивами, в результате чего образуется окрашенный продукт реакции.

При выявлении локализации некоторых компонентов клетки прибегают к многоступенчатым промежуточным реакциям и переводу неокрашенного продукта реакции в окрашенный. Например, так поступают при гистохимическом окрашивании ферментов.

Метод гистохимии получил широкое распространение в исследовательской практике. В настоящее время ни одна морфологическая лаборатория не обходится без применения гистохимических методик. Однако успешное владение ими требует усвоения определенных навыков и соблюдения ряда условий, так как в отличие от гистологических методик, носящих большей частью эмпирический характер, гистохимические основаны на определенных химических механизмах и обладают строгой специфичностью. Отсюда главное требование – особая точность и тщательность в работе.

Критерием в оценке результатов гистохимической реакции является не только локализация химических веществ, но и интенсив-

ность окраски исследуемых компонентов клеток и тканей, так как именно она свидетельствует о концентрации выявляемых веществ. Если при гистологической обработке материала возможны некоторые отклонения в ходе окрашивания препарата, то приемы, используемые для подготовки материала и проведения гистохимических реакций, должны тщательно соблюдаться, ибо отклонения на любом этапе могут изменить ход реакции и в конечном итоге привести к неправильной оценке препарата.

Для создания надлежащих условий протекания химических реакций особое внимание нужно уделить приготовлению рабочих растворов, а также чистоте применяемой посуды и стекол, качеству реактивов и т. д.

Цито- и гистохимические методы исследования позволяют выявлять локализацию различных химических веществ в структурах клеток, тканей и органов – ДНК, РНК, белков, углеводов, липидов, аминокислот, минеральных веществ, витаминов, активность ферментов. Эти методы основаны на специфичности реакции между химическим реактивом и субстратом, входящим в состав клеточных и тканевых структур, и окрашивании продуктов химических реакций. Для контроля специфичности реакции часто применяют соответствующие ферменты. Например, для выявления в клетках рибонуклеиновой кислоты (РНК) часто используют галлоцианин – краситель с основными свойствами, а наличие РНК подтверждают контрольной обработкой рибонуклеазой, расщепляющей РНК. Галлоцианин окрашивает РНК в сине-фиолетовый цвет. Если срез предварительно обработать рибонуклеазой, а затем окрасить галлоцианином, то отсутствие окрашивания подтверждает наличие в структуре рибонуклеиновой кислоты.

Сочетание гистохимических методов с методом электронной микроскопии привело к развитию нового перспективного направления – *электронной гистохимии*. Этот метод позволяет изучать локализацию различных химических веществ не только на клеточном, но и на субклеточном и молекулярном уровнях. Для изучения макромолекул клеток используют очень чувствительные методы с применением радиоактивных изотопов и антител, позволяющие обнаружить даже небольшое содержание молекул (менее 1000).

Радиоактивные изотопы при распаде ядра испускают заряженные частицы (электроны) или излучение (например, гамма-лучи), которые можно зарегистрировать специальными приборами. Радиоактивные изотопы используют в методе радиоавтографии. Например, с

помощью радиоизотопов ^3H -тимидина исследуют ДНК ядра, а с помощью ^3H -уридина – РНК.

В настоящее время гистохимия перешла на количественный уровень исследования с применением специальных приборов – *цитоспектрофотометров*, позволяющих довольно точно определять количественную характеристику интенсивности окраски (продукта реакции), что особенно важно для оценки состояния метаболизма в исследуемых органах, тканях и отдельных клетках. Это еще в большей степени предъявляет повышенные требования к качеству проведения гистохимических реакций и соблюдению строгой стандартизации обработки сравниваемых объектов на всех этапах. Именно в этих целях в первую очередь применяют совмещение сравниваемых образцов в одном блоке с последующим получением срезов одинаковой толщины на одном стекле. Когда это сделать невозможно, необходимо в ходе резки располагать разные срезы на одном предметном стекле. При любом способе совмещения сравниваемые срезы следует подвергать всем этапам гистохимических реакций одновременно, используя одни и те же порции реактивов

Окрашивание липидов и липоидов (Судан III)

Окрашивание жира и липоидов очень часто применяют в гистологической и патолого-анатомической практике. Различные методики окраски позволяют не только обнаружить жиры и жироподобные вещества в клетках и тканях, но и судить о характере этих веществ. Часто для этой цели употребляют Судан III, IV, шарлах красный, нильблаусульфат и осмиевую кислоту.

Окраска Суданом III – одна из наиболее часто применяемых. Указанный краситель выявляет все жиры и липоиды, нейтральные жиры интенсивно окрашиваются в оранжево-красный цвет.

Для выявления жиров требуется формалиновая фиксация не более 48 часов. После промывки кусочки режут на замораживающем микротоме. Обычные методы заливки применять нельзя, так как эфир, ксилол и крепкие спирты, употребляемые при заливке, растворяют и извлекают жиры из изучаемых объектов.

Метод окраски Суданом III основан на том, что эти краски хорошо растворяются в жирах. Из насыщенных спиртовых растворов Судан III легко переходит в жир окрашиваемых тканей. Растворимость Судана III в жирах гораздо выше, чем в спирте.

Окрашивание Суданом III является наиболее распространенным методом выявления жира.

Приготовление раствора красителя.

В 100 мл горячего 70 %-го спирта засыпают 0,2–0,3 г порошка Судана III, несколько раз взбалтывают и ставят в термостат (при 58 °С) на несколько часов, затем охлаждают и фильтруют.

Метод окрашивания:

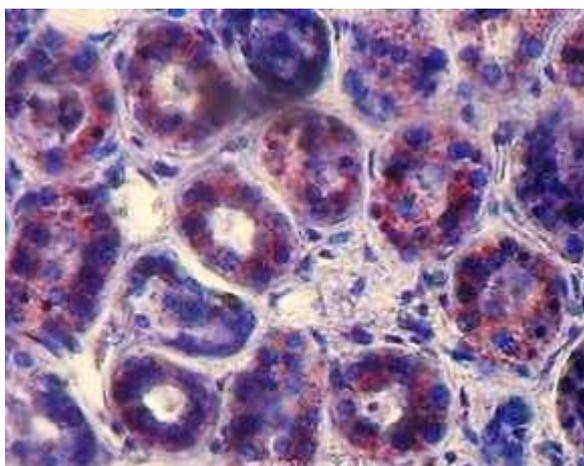
- замороженные срезы (из свежей или фиксированной в формалине ткани) на несколько минут переносят из воды в 50 %-й спирт;
- помещают в спиртовой раствор красителя на 15–30 минут (при применении щелочного раствора Судана III – на 5 минут);
- быстро ополаскивают в 50 %-м спирте;
- промывают в дистиллированной воде;
- подкрашивают ядра кислым гемалауном или гематоксилином Эрлиха;
- промывают и заключают в желатин или глицерин-желатин.

Результат: жировые вещества интенсивно оранжево-красного цвета, ядра – синие (рис. 162).

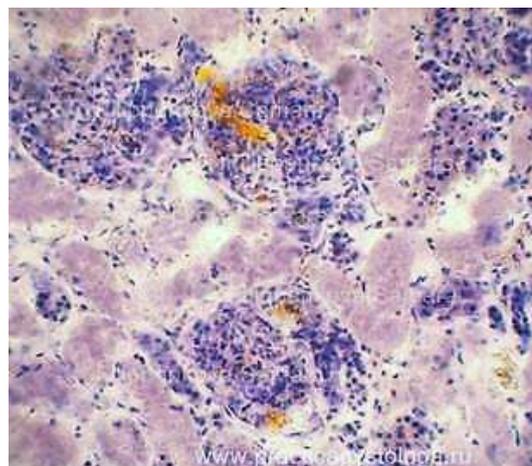
Окраску срезов раствором Судана III следует проводить в бюксе с закрытой крышкой. В противном случае спирт испаряется, и из насыщенного раствора Судан III выпадает в виде осадка, который остается в препарате.

Окраска жира Суданом III довольно быстро выцветает, поэтому желательно исследовать препараты вскоре после их изготовления.

Окрашенные на жир срезы нельзя обезвоживать и заключать обычным способом: это вызвало бы растворение и извлечение жира из препарата (ксилол, в котором растворяют бальзам, растворит и жиры). Учитывая сказанное, срезы после окраски на жир заключают в глицерин или глицерин-желатин, которые не растворяют жир и хорошо просветляют необезвоженный препарат. Жидкий глицерин не дает возможности фиксировать покровное стекло над препаратом. Для укрепления покровного стекла его по краям покрывают валиком из расплавленного парафина, а лучше из менделеевской замазки. Чтобы добиться хорошего прикрепления покровного стекла, надо, заключая препарат, наносить на него такое количество глицерина, которое не достигало бы краев покровного стекла. После заключения в глицерин-желатин при длительном хранении препаратов наблюдается выпадение Судана III в виде красных кристаллов.



А



Б

Рисунок 162 – Жировая дистрофия почек: жировые капли в клетках эпителия почечных канальцев (А) и сосудистых клубочков почечных телец (Б); (окраска: Судан III; x250)

Окраска соединительной ткани по методу Маллори

Трехцветную окраску по Маллори используют для исследования волокнистых структур соединительной ткани. Окрашивание осуществляют тремя красителями:

- *анилиновым синим;*
- *кислым фуксином;*
- *оранжевым G.*

В основе метода лежит уникальное свойство анилинового синего окрашивать коллагеновые волокна в зеленовато-голубой, а кислого фуксина – эластические волокна в красный цвет (рис. 163).

В результате окраски, коллагеновые волокна – темно синие, ядра, эритроциты, эластические волокна – красные, амилоид, гиалин и слизь – голубые, мышечная ткань – оранжевая, нейроглия – красно-фиолетовая. Окраска по Маллори чрезвычайно распространена в различных вариантах. Окрашиваются парафиновые и целлоидиновые срезы (рис. 163, 164).

Метод хорошо выявляет различные элементы соединительной ткани, особенно коллагеновые и ретикулиновые волокна. Его можно использовать и для окрашивания мышечной и других тканей. Материал лучше фиксировать в сулемовых фиксаторах, особенно в смеси Ценкера.

Если материал зафиксирован в формалине, то перед окрашиванием срезы следует помещать в жидкость Ценкера на 15–30 мин. За-

тем на несколько минут срезы погружают в спиртовой раствор йода, что позволяет освободить срезы от осадков дихлорида ртути. После этого срезы помещают в 0,25 %-й раствор тиосульфата натрия (гипосульфита), чтобы восстановить йод.

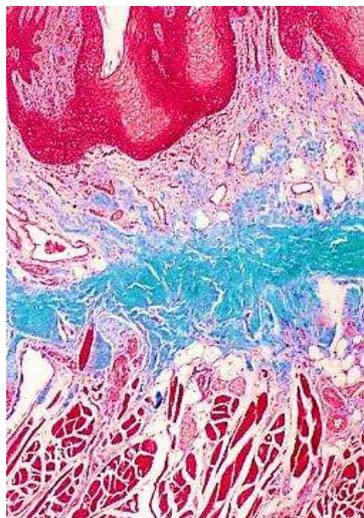


Рисунок 163 – Кожные покровы
(окраска: по Маллори; $\times 40$)

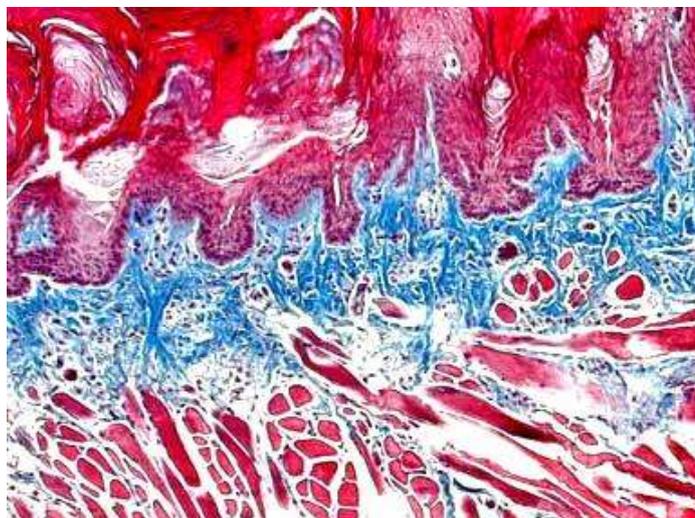


Рисунок 164 – Кожные покровы
(окраска: по Маллори; $\times 400$)

Рабочие растворы

Необходимо иметь три рабочих раствора:

- водный раствор кислого фуксина 0,1 %-й;
- раствор фосфорно-молибденовой кислоты 1 %-й;
- смесь, состоящая из анилинового синего, оранжевого G и щавелевой кислоты.

Для приготовления красящей смеси 0,5 г анилинового синего, 2 г оранжевого G и 2 г щавелевой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Эту смесь нагревают до кипения, охлаждают и фильтруют. Когда составные части растворяются, смесь приобретает интенсивно коричневый цвет с зеленоватым оттенком. Раствор пригоден к употреблению сразу после приготовления. После долгого хранения перед употреблением раствор необходимо прокипятить и профильтровать.

Окрашивание:

- после освобождения от парафина срезы из дистиллированной воды переносят в раствор 0,1 %-го кислого фуксина на 2–3 минуты;
- быстро промывают в дистиллированной воде 1–2 минуты;
- для закрепления, окраски кислым фуксином срезы переносят в 1 %-й раствор фосфорно-молибденовой кислоты на 3–5 минуты;

- быстро ополаскивают в дистиллированной воде;
- переносят срезы в свежeproфильрованную смесь анилинового синего, оранжевого G и щавелевой кислоты на 1 минуты (следует избегать переокрашивания);
- промывают срезы в дистиллированной воде;
- дифференцируют в 96 %-м спирте 3–5 мин и более, пока под микроскопом не появятся окрашенные в синий цвет коллагеновые волокна;
- проводят через абсолютный спирт, ксилол, заключают в канадский бальзам.

Результат

Коллагеновые и ретикулиновые волокна – темно-синего цвета, слизь – синего, эритроциты – красно-оранжевого, мышечные волокна – ярко-оранжевого, хроматин – красного с желтоватым оттенком, нейроглия и ганглиозные клетки – красновато-фиолетового, секреторный гранулы – красного цвета (рис. 165, 166).

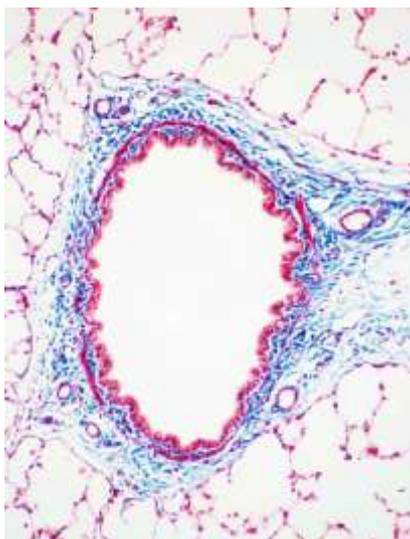


Рисунок 165 – Бронхиола легкого (окраска: по Маллори; x40)

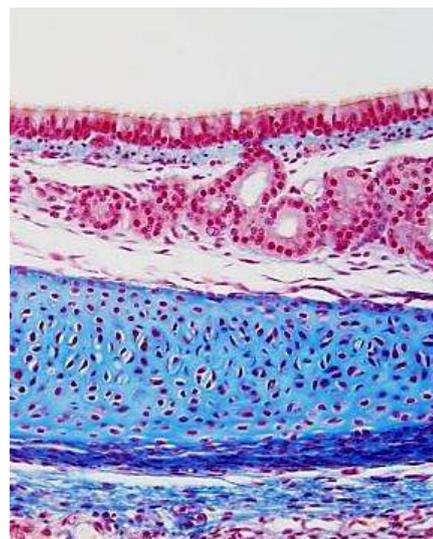


Рисунок 166 – Бронх легкого (окраска: по Маллори; x400)

Окраска по методу Перлса

Окраска по методу Перлса (окраска берлинской лазурью; железной лазурью; прусским синим; парижской лазурью; прусской лазурью; гамбургской синью; нейблау) – метод распространен для выявления в тканях соединений железа, например, при диагностике гемохроматозов и выявления гемосидероза – состояний при которых в тканях, по тем или иным причинам, накапливается избыток соединений железа, что, в конечном счете, приводит к недостаточности внутренних органов. В окраске используют не готовый пигмент: образо-

вание пигмента в этом случае происходит непосредственно в срезе ткани, связано с соединениями железа, расценивается как положительная реакция.

Оригинальная методика окраски, описанная в 1867 году как «берлинская лазурь Перлса» названа в честь ее автора – немецкого патолога Макса Перлса (*Max Perls*) (1843–1881), использовавшего растворы гексацианоферрата (II) калия и соляной кислоты. Депозиты соединений железа в тканях под действием этих растворов образуют собственно берлинскую лазурь, гранулы которой, цвета разных оттенков синего, видны в препарате под микроскопом.

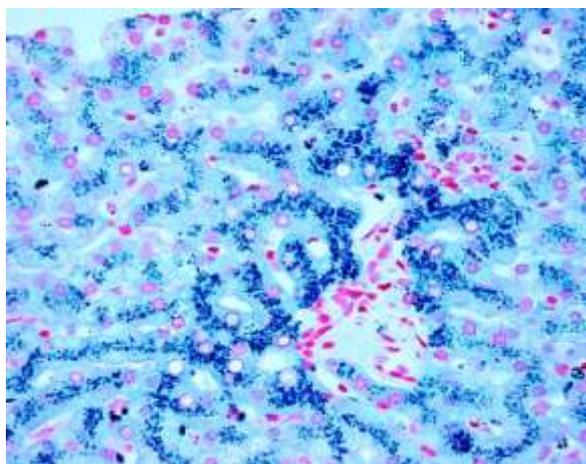
Реактивы:

- желтая кровяная соль, 2 %-й раствор: желтая кровяная соль – 2 г; дистиллированная вода – 100 мл. Раствор должен быть бесцветным;
- 1 N раствор HCl;
- метиловый спирт;
- солянокислый спирт.

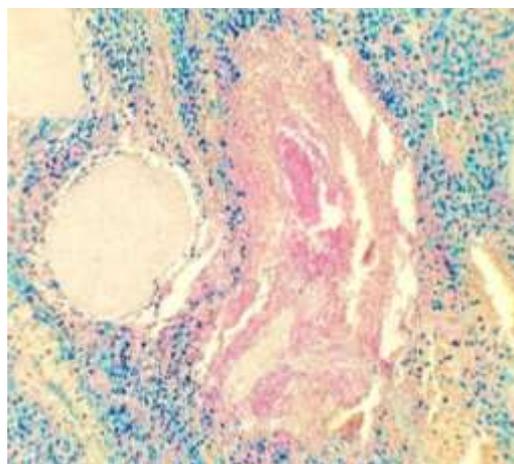
Ход реакции:

- препарат обесцвечивают метанолом или солянокислым спиртом;
- ополаскивают в дистиллированной воде;
- заливают 1 N раствором соляной кислоты на 30 мин;
- добавляют в кислоту равное количество 2 %-го раствора гексацианоферрата тригидрата (желтой кровяной соли), перемешивают и окрашивают в течение 10 мин;
- ополаскивают в дистиллированной воде;
- высушивают.

При микроскопии видно следующее: гранулы гемосидерина окрашиваются ярко-голубой цвет (рис. 167, 168).



*Рисунок 167 – Гемосидероз печени
(окраска по Перлсу; x400)*



*Рисунок 168 – Гемосидероз селезенки
(окраска по Перлсу; x40)*

Количественные методы

В настоящее время наряду с качественными методами разработаны и применяются количественные гистохимические методы определения содержания различных веществ в клетках и тканях. Особенность количественных гистохимических (в отличие от биохимических) методов исследования заключается в возможности изучения концентрации химических компонентов в конкретных структурах клеток и тканей.

Цитоспектрофотометрия – метод изучения химического состава клетки, основанный на избирательном поглощении теми или иными веществами лучей с определенной длиной волны. По интенсивности поглощения монохроматического света, которая зависит от концентрации вещества, производят определение его содержания в клетке. Так определяют содержание ДНК в ядре, РНК и суммарного белка в цитоплазме и др.

Цитоспектрофлюориметрия – метод количественного изучения внутриклеточных веществ по спектрам их флюоресценции или по интенсивности флюоресценции при облучении препарата заранее выбранной длиной световой волны (цитофлюориметрия). При этом используют флюорохромы, количественно связывающиеся с веществами клетки (ДНК, РНК, белками и др.).

Современные микроскопы – цитофлюориметры позволяют обнаружить в различных структурах малые количества вещества (до 10^{-14} – 10^{-16} г) и оценить локализацию исследуемых веществ в микроструктурах.

Интерферометрия – этот метод позволяет оценить сухую массу и концентрацию плотных веществ в живой и фиксированной клетках. С помощью этого метода, например, можно установить суммарное содержание белков в живых и фиксированных клетках.

5.2. Метод иммунофлюоресценции и иммуногистохимии

Антитела – защитные белки, вырабатываемые плазмоцитами (производными В-лимфоцитов) в ответ на действие чужеродных веществ (антигенов). Количество различных форм антител достигает миллиона. Каждое антитело имеет участки для «узнавания» молекул, вызвавших синтез этого антитела. В связи с высокой специфичностью антител в отношении антигенов они могут быть использованы

для выявления любых белков клетки. Метод основан на реакциях антиген – антитело. Каждая клетка организма имеет специфический антигенный состав, который главным образом определяется белками. Для усиления специфичности реакции применяют моноклональные антитела, образуемые линией клеток, – клонами (одна линия – один клон), полученной гибридным методом из одной клетки.

Иммунофлюоресцентный метод – единственный в своем роде морфологический метод, позволяющий исследовать топографию в клетках и тканях сложных биологических веществ (эндогенного или экзогенного происхождения), наделенных индивидуально специфической структурой (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты и др.).

Сущность данного метода сводится к следующему. Веществом, идентичным тому, локализацию которого в исследуемом объекте (ткани, клетки) хотят изучить, иммунизируют другое животное и через определенное время (достаточное для выработки антител) из его крови получают антисыворотку. Антитела, содержащиеся в у-глобулиновой фракции антисыворотки, химическим путем соединяют с флюорохромом (особым соединением, способным давать яркое свечение – флюоресценцию – под действием ультрафиолетовых лучей).

На гистологические срезы свежемороженых или фиксированных органов (тканей) наносят каплю конъюгата – антисыворотки, соединенной с флюорохромом, и после 20–30-минутной экспозиции отмывают изотоническим раствором хлорида натрия несвязавшиеся флюоресцирующие антитела.

Препарат заключают в забуференный глицерин или полистирол. Наблюдение проводят с помощью люминесцентного микроскопа в ультрафиолетовой части спектра. Вещества, с которыми специфически прореагировали антитела, выявляют по флюоресценции связанного с последними флюорохрома.

Наряду с описанным выше вариантом данного метода, получившим название прямой иммунофлюоресценции, была разработана другая его разновидность – *непрямая иммунофлюоресценция*, характеризующаяся, как правило, более высокой специфичностью по отношению к выявляемому субстрату.

Метод *непрямой иммунофлюоресценции* отличается от прямого метода тем, что часть полученных после первой иммунизации антител (А-1) используют для иммунизации второго животного, в резуль-

тате чего получают антисыворотку, содержащую антитела (А-2) к А-1. А-2 комплексируют с флюорохромом.

На срезы наносят антисыворотку, содержащую А-1, и после отмывки антител, несвязавшихся с искомым веществом, антисыворотку, содержащую А-2 (флюоресцирующие). А-2 реагируют с А-1 и таким образом «фиксируются» в местах локализации исследуемого вещества.

Электронно-микроскопические варианты иммунофлюоресцентного метода имеют некоторые особенности. В одних случаях к антителам иммунной антисыворотки присоединяют какой-либо электронно-микроскопический агент (например, атом тяжелого металла), в других – соединение (группу), включающее в себя радиоактивный атом. В последнем случае для выявления локализации комплекса антиген–антитело необходимо проведение дополнительной автордиографии.

Метод иммунофлюоресценции характеризуется большой чувствительностью и позволяет обнаруживать вещества, присутствующие в клетках и тканях органа в очень низких концентрациях.

Метод гибридом – позволяет получать моноклональные антитела с одинаковой специфичностью и в неограниченных количествах. Антитела можно использовать для изучения антигенов как на световом, так и на ультраструктурном уровнях с помощью электронного микроскопа.

В клинической диагностике широкое применение получили *методы иммуногистохимии на парафиновых срезах*. Предложено большое количество молекулярных маркеров и методов обнаружения белков промежуточных филаментов, пролиферативных, дифференцировочных и апоптозных белков в клетках. Для стандартизации обработки препаратов используется *иммуностейнер* – устройство, с помощью которого все операции проводятся без вмешательства со стороны исследователя.

Методы *иммунофлюоресцентного* и *иммуногистохимического* анализов широко и эффективно используют в научных исследованиях и в лабораторной диагностике. Продукты реакции можно окрашивать флюоресцирующими красителями и выявлять в люминесцентном микроскопе или использовать специальные наборы реактивов, которые окрашивают исследуемые белки, и анализировать препараты с помощью светового микроскопа. Эти методы применяют для изучения процессов дифференцировки клеток, выявления в них специфич-

ческих химических соединений и структур. Методы позволяют с высокой точностью охарактеризовать функциональное состояние клеток, выявить гистогенетическую принадлежность и трансформацию клетки при онкологических заболеваниях.

5.3. Метод автордиографии

В отличие от гистохимии, которая позволяет определять лишь локализацию и концентрацию химических веществ в структуре, автордиография, позволяет изучать распределение различных веществ в клетках, тканях и органах всего организма, пути и механизмы их поступления и выделения из него и др. В основе автордиографии (как светооптической, так и электронно-микроскопической) лежит процесс, аналогичный фотографическому, с тем отличием, что «засвечивающим» фактором при автордиографии является не свет, а ионизирующее излучение, испускаемое при распаде ядер радиоактивных атомов, введенных в организм в форме тех или иных соединений. Вместо же фотографической пластинки (пленки) используют специальную эмульсию, которой покрывают гистологические среды (а также мазки, отпечатки органов и т. д.) с целью обеспечения ее наиболее тесного контакта с исследуемыми структурами. После экспозиции, достаточной для того, чтобы кристаллы бромида серебра (входящие в состав эмульсии), находящиеся в непосредственной близости от места локализации радиоактивного изотопа, превратились в зерна металлического серебра, срезы проявляют, окрашивают, обезвоживают и заключают в бальзам. При микроскопировании автографов места локализации радиоактивных атомов выявляются в виде черных зерен. По количеству зерен можно судить (до некоторой степени) о количестве сконцентрированной в данной области радиометки.

Техника использования метода автордиографии для исследования процесса биосинтеза ДНК при митотическом делении клеток эпителия тонкой кишки у крысы:

- крысе внутрибрюшинно вводят Н-тимидин (один из компонентов молекулы ДНК) из расчета 1 мкКи на 1 г массы тела и забивают через 1–12 ч;
- фрагмент тонкой кишки фиксируют (чаще всего в 10 %-м формалине или жидкости Карнуа), обезвоживают и заливают в парафин;
- приготавливают гистологические срезы толщиной 7 мкм;

- депарафинируют в двух-трех сменах ксилола (толуола) по 1–2 мин;
- высушенные срезы покрывают эмульсией при температуре 42 °С (в фотокомнате при темно-красном фонаре);
- укладывают в светонепроницаемую коробку и выдерживают в холодильнике 14–30 сут.;
- проявляют в амидоловом проявителе;
- ополаскивают дистиллированной водой.
- погружают в «стоп-раствор» (1 %-й раствор уксусной кислоты) на 0,5–1 минут;
- фиксируют в 30–40 %-м растворе тиосульфата натрия 1 мин;
- промывают проточной водой 20–30 мин;
- высушивают на воздухе;
- окрашивают гематоксилином и эозином (как обычно);
- обезвоживают в спиртах восходящей концентрации;
- просветляют и заключают в бальзам.

Метод радиоавтографии – дает возможность наиболее полно изучить обмен веществ в разных структурах. В основе метода лежит использование радиоактивных элементов (например, фосфора – ^{32}P , углерода – ^{14}C , серы – ^{35}S , водорода – ^3H) или меченных ими соединений. Радиоактивные вещества в гистологических срезах обнаруживают с помощью фотоэмульсии, которую наносят на препарат и затем проявляют. В участках препарата, где фотоэмульсия соприкасается с радиоактивным веществом, происходит *фотореакция*, в результате которой образуются засвеченные участки (треки). Этим методом можно определять, например, скорость включения меченых аминокислот в белки, образование нуклеиновых кислот, обмен йода в клетках щитовидной железы и др.

5.4. Методы анализа изображения клеточных и тканевых структур

Полученные изображения микрообъектов в микроскопе, на экране дисплея, на электронных микрофотографиях могут подвергаться специальному анализу – выявлению морфометрических, денситометрических параметров и их статистической обработке.

Морфометрические методы позволяют определять с помощью специальных сеток (Е. Вейбеля, А. А. Глаголева, С. Б. Стефанова) число любых структур, площади их сечений, диаметры и др. В част-

ности в клетках могут быть измерены площади ядер, цитоплазмы, их диаметры, ядерно-цитоплазматические отношения и др.

Существуют *ручная морфометрия* и *автоматизированная морфометрия*, при которой все параметры измеряются и регистрируются в приборе автоматически.

Все большее распространение получают *автоматизированные системы обработки изображений* (АСОИз), позволяющие наиболее эффективно реализовать перечисленные выше количественные методы для изучения клеток и тканей. При этом аналитические возможности количественной микроскопии дополняются методами анализа и распознавания образцов, основанными на обработке с помощью электронно-вычислительных машин (ЭВМ) информации, извлекаемой из изображений клеток и тканей. По существу можно говорить об устройствах, не только усиливающих оптические возможности зрительного анализатора человека, но и многократно расширяющих его аналитические возможности. Это позволяет получать новую информацию о не выявляемых ранее процессах, моделировать и прогнозировать их развитие в клетках и тканях.

Вместе с тем участие в эксперименте ЭВМ требует от исследователя нового подхода к его проведению, владения навыками составления алгоритмов процесса исследования, точности рассуждений и в конечном итоге повышения научно-методического уровня исследования.

Контрольные вопросы

1. Каковы принципы, цели и задачи изготовления гистохимических препаратов?
2. Перечислите основные виды красителей и способы окрашивания, применяемые в гистохимии.
3. Какова сущность и техника метода автордиографии для исследования процесса биосинтеза ДНК?
4. В чем состоит сущность метода автордиографии?
5. Значение и сущность методов иммунофлюоресценции и иммуногистохимии.
6. Перечислите основные этапы техники окраски гистологических срезов по методу Перлса, для определения наличия каких веществ ее проводят?
7. В чем состоит сущность окраски тканей по методу Маллори? С какой целью ее используют?
8. Какова техника гистохимической окраски тканей Суданом III? Для определения каких веществ ее проводят?

ТЕМА 6. БИОПСИЯ: ВИДЫ, ПРАВИЛА ЗАБОРА БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Биопсия (от др.-греч. βίος – жизнь + ὄψις – внешний вид) – метод исследования, при котором проводится прижизненный забор клеток или тканей (биоптата) из организма с диагностической или исследовательской целью. Любая инвазивная процедура сопряжена с определенным риском, биопсия – не исключение. Пункция выполняется под местным или общим обезболиванием с использованием релаксантов. Обезболивание напрямую зависит от локализации патологического процесса. В ряде случаев допустимо выполнение манипуляции без анестезии. От техники забора зависит результативность изучения материала морфологом, а соответственно, и достоверность гистологических ответов.

Для забора материала используют только стерильный инструмент. В клинической практике применяют три группы биопсийных игл:

- *режущие;*
- *аспирационные;*
- *модифицированные.*

Каждый вид иглы имеет свое назначение. Любая попытка нарушить целевое использование инструмента может привести к ряду нежелательных последствий, осложнений.

Следует помнить, следующее:

– от контакта с водой клетки, в том числе опухолевые разрушаются;

– обилие элементов крови может затруднять постановку правильного диагноза.

Диагностическое значение имеют только положительные результаты, т. е. окончательный гистологический ответ (заключение). Полученные отрицательные результаты морфологического исследования не исключают наличие патологии (опухоли), а при убедительных клинико-инструментальных данных заставляют задуматься о проведении повторной биопсии. Выполнение пункционного обследования больше трех раз обычно нецелесообразно.

Забор опухолевого материала может производиться разными способами. Выделяют следующие основные виды биопсий:

- *аспирационная;*
- *эксцизионная;*
- *инцизионная;*
- *пункционная и прицельная*, как элемент взятия биопсии с помощью многоразовых биопсийных щипцов.

Аспирационная биопсия – метод предусматривает выполнение чрескожного прокола. Полая игла с заданным диаметром вводится непосредственно в патологический очаг, а затем извлекается. В полости остаются практически все участки тканей, через которые она прошла (слой). Метод включает две диагностические процедуры. К ним относят гистологическое и цитологическое исследование. Первое заключается в выполнении среза с поврежденного органа, окрашивании его и микроскопии. Цитологическое исследование заключается в выполнении мазка с поверхности биоптата и солидный материал отправляется на микроскопию.

Инцизионная биопсия – проводится во время хирургической операции, но при этом удаляется не весь орган, а только некая часть. Применима при больших размерах патологического образования, из которого иссекают сегмент эллиптической формы по краю. Размеры иссекаемого фрагмента должны быть не меньше 1,0×1,0 см, иначе возникают трудности в трактовке морфологической картины для патологоанатома в последующем. Опухолевая ткань должна иссекаться не в центре новообразования, а с периферии. При этом обязательно проводить иссечение вместе с опухолевой и частью интактной ткани. Достоинством биопсии является то, что она выполняется под визуальным контролем, что позволяет выбрать наиболее характерный участок опухоли.

Эксцизионная биопсия – является наиболее масштабным видом биопсии. Производится удаление полностью всего органа или патологического образования. Если размеры опухоли менее 2,5 см в результате хирургического вмешательства происходит удаление всего исследуемого образования, чтобы захватить ткань, расположенную под опухолью, не менее чем на 1 см и не менее 0,5–1 см от края удаляемого образования (клиновидная резекция, перпендикулярное направление). Если фрагмент опухоли иссекается на периферии с участком здоровой ткани, то патоморфолог сможет увидеть под микроскопом границу опухоли с интактной тканью. Если новообразование доброкачественное, то в препарате четко будет видна его капсула, если злокачественное, то определяются признаки инфильтрирующего

роста. При опухолях, размеры которых превышают 2,5 см, возможно удаление только ее части. В этих случаях делают выскабливание (кюретаж), либо небольшой кусочек вырезают остро. Фиксация исследуемого кусочка происходит в сосуде, который должен быть таким, чтобы кусочек свободно размещался в нем и был полностью погружен в фиксирующую жидкость.

Методы биопсии

Трепан-биопсия – диагностическая процедура, при которой для анализа берут столбик плотной ткани. Является наиболее информативным и доступным методом исследования. Проводится при помощи специального инструмента – трепана. Трепан-игла представляет собой трубку, полую внутри, с заостренным нижним краем. С помощью полученного столбика удастся микроскопически оценить архитектуру полученной ткани (клеточная строма, кровеносные сосуды, жировая и кроветворная ткань) (рис. 169).

Щипковая биопсия – метод взятия материала для гистологии, используемый в эндоскопической хирургии. Для взятия материала используются специальные биопсийные щипцы – форцепты (рис. 170).



Рисунок 169 – Игла для трепан-биопсии костной ткани



Рисунок 170 – Щипцы для взятия образцов ткани при проведении эндоскопии с целью проведения дальнейших морфологических исследований

Петлевая (электрохирургическая) биопсия – метод забора тканей с помощью специального коагулятора, представляющего собой тонкую проволочную петлю, через которую проводят высокочастотный электрический ток слабого напряжения (рис. 171). Основная область применения данного метода – эндоскопическая хирургия.

Скарификационная (поверхностная) биопсия или shaving biopsy (от англ. *shave* – брить) – метод взятия материала на гистологию путем срезания тонкого слоя тканей с поверхности образования. Данный метод, в основном, применяют при диагностике кожных образований (рис. 172).

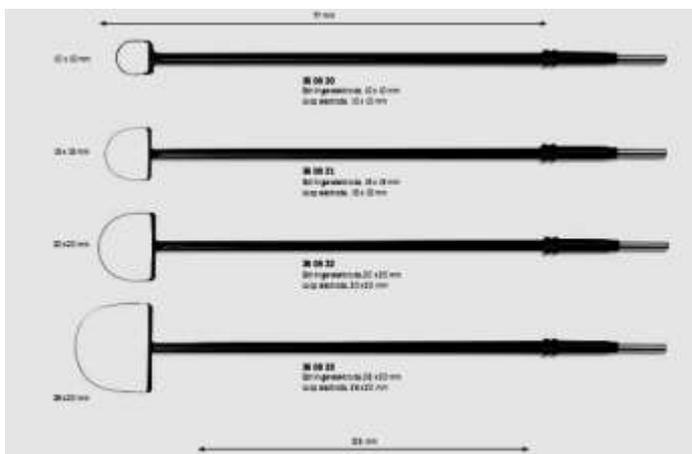


Рисунок 171 – Электрод-петля для проведения электрохирургической биопсии



Рисунок 172 – Скарификационная биопсия с помощью обычного бритвенного лезвия

Панч-биопсия (от англ. *punch* – дырокол, компостер) – метод взятия патологического материала, преимущественно кожи с помощью специального трубчатого скальпеля – панча (рис. 173). Этот метод позволяет получить цилиндрический образец ткани заданной высоты и диаметра. Выбор места биопсии зависит от вида поражения. Поэтому перед взятием материала проводится консультация с врачом-морфологом.

При взятии материала панч направляют перпендикулярно поверхности кожи, растягивая ее по сторонам. При этом на панч слегка надавливают сверху вниз и вращают его по и против часовой стрелки до погружения на требуемую глубину. После панч аккуратно извлекают. С помощью иглы из полости скальпеля извлекают биоптат и при помощи острых ножниц или лезвия отделяют нижнюю часть образца от тела пациента (рис. 174). При необходимости на образовавшуюся ранку накладывают швы и бактерицидный пластырь.

Прежде, чем фиксировать взятый материал, делают аккуратный отпечаток на предметном стекле, приложив отобранный биоптат боковой стороной к поверхности стекла. Запрещено делать мажущие

движения по стеклу, чтобы не вызвать раздавливания клеток и не размазать по поверхности стекла жировые клетки подкожной клетчатки, которые будут препятствовать сцеплению других клеток с предметным стеклом.



Рисунок 173 – Панчи для взятия материала по методу панч-биопсии

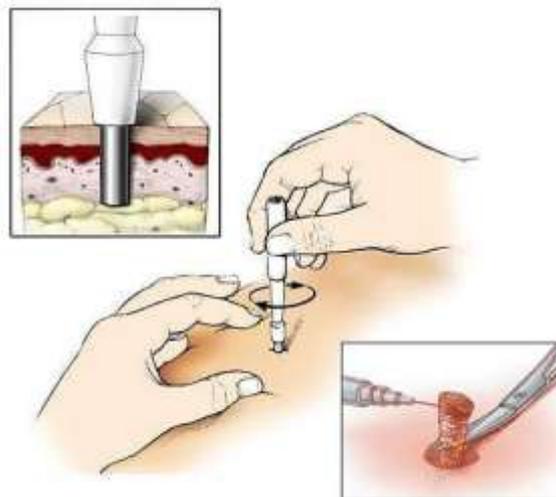


Рисунок 174 – Техника проведения панч-биопсии

Кор-биопсия (от англ. *core* – сердцевина; синон. – сердцевинная или режущая биопсия) – метод взятия патологического материала в виде тканевого столбика с помощью специальной иглы на подобии гарпуна и биопсийного пистолета (рис. 175). В отличие от панч-биопсии, которая позволяет брать материал с поверхности тела, кор-биопсия делает возможным взятие полноценных гистологических образцов из глубоколежащих тканей и внутренних органов. При этом диаметр иглы такой же, как и при цитопункции, что позволяет обойтись минимальным травмированием животного.

Принцип метода заключается в том, что пистолет с большой скоростью выстреливает в заданную область гарпунную часть иглы. Гарпун имеет желоб, в котором фиксируется образец мягких тканей. После этого с такой же высокой скоростью выстреливается трепанная часть иглы, которая своей режущей кромкой срезает тканевой столбик, расположенный в гарпуне. Таким образом, удастся получить полноценную ткань образования или внутреннего органа для последующего гистологического исследования.



Рисунок 175 – Пистолет для взятия материала методом кор-биопсии

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию биопсия.
2. Какие виды биопсий вы знаете?
3. Какова техника проведения аспирационной биопсии?
4. Что такое инцизионная биопсия? Каким образом ее осуществляют?
5. Какие основные методы биопсии вам известны?
6. При помощи какого специального инструмента проводят трепан-биопсию?
7. В каких случаях осуществляют электрохирургическую биопсию?
8. Какие инструменты используют для проведения панч-биопсии и кор-биопсии?
9. Опишите технику взятия тканевого материала с помощью панч-биопсии.

ТЕМА 7. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ

Исследование живых объектов (витальное и суправитальное) – дает возможность наблюдать физиологические и патологические процессы в клетках и тканях, исследовать прижизненное их строение в норме и при патологии (рис. 176).

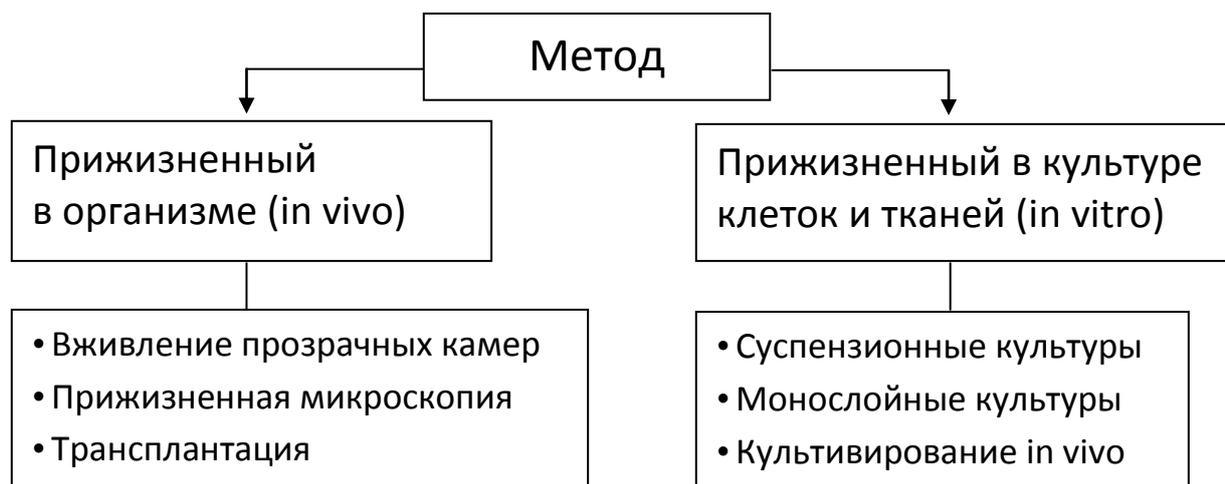


Рисунок 176 – Методы исследования живых клеток и тканей

Витальным наблюдением (in vivo) принято называть исследование клеток и тканей в живом организме: вживление прозрачных камер, прижизненную микроскопию, трансплантацию.

Суправитальным наблюдением (in vitro) называют исследование живых клеток и тканей, выделенных из организма непосредственно перед исследованием и помещенных в соответствующие условия наблюдения.

Суправитальные наблюдения можно проводить на клетках свободно взвешенных в жидкой среде или выделенных из фрагментов тканей (простейшие, клетки крови, эпителиальные клетки соскобов слизистых оболочек и т. п.): суспензионные культуры, монослойные культуры, культивирование *in vivo*.

7.1. Методы прижизненного наблюдения клеток и тканей

Большие возможности для прижизненного наблюдения клеток и тканей дает *метод культуры клеток и тканей*.

Метод культуры клеток и тканей. При этом извлеченные из организма кусочки тканей помещают в специальные питательные сре-

ды, где клетки растут, размножаются или некоторое время находятся в состоянии «*переживания*». С помощью этого метода визуальным путем или способом микрокиносъемки анализируют свойства исследуемых тканей, их способность к пролиферации, автономному росту, чувствительность к различным факторам и пр.

Клетки помещают в капле физиологического раствора или среды, в которой они культивируются, на предметное стекло (обычный размер 76×26 мм, толщина 1–2 мм), накрывают покровным стеклом (обычный размер 18×22 мм, толщина 0,15–0,20 мм) и изучают под микроскопом.

Для предотвращения охлаждения и высыхания препаратов используют специальные приспособления (камеры с подогревом и заданной влажностью, нагревательные столики и т. п.). Простейшим приемом, предотвращающим высыхание препаратов, может служить смазывание краев покровного стекла растопленным парафином, вазелином и т. п.

Культивирование клеток в диффузионных камерах. Для изучения процессов образования антител, продукции гормонов, кровотока, злокачественного роста и других нередко применяют *культивирование клеток в диффузионных камерах*, стенки которых сделаны из миллипорных фильтров, пропускающих макромолекулы, но не пропускающих клетки. Такие камеры имплантируют в различные ткани организма, наблюдая изменения находящихся внутри камеры клеток под влиянием гуморальных факторов организма или веществ, введенных в камеру одновременно с клетками.

Исследование тканевых пленок. Объектом прижизненного наблюдения могут служить и тонкие, пропускающие свет тканевые пленки (брыжейка, плавательные перепонки и т. п.). Выделенную брыжейку животных, например, можно наблюдать под микроскопом, не нарушая ее нервных и сосудистых связей с организмом.

Помещая органы во влажные прозрачные камеры, можно наблюдать многие микрофизиологические процессы в ряде органов лабораторных животных. Так удалось наблюдать у крысы процесс овуляции и перемещения яйцеклетки из яичника в яйцевод (Блум и Фоситт (W. Bloom, D. Fawcett), 1968).

Методы выведения органов и тканей во влажные прозрачные камеры без нарушения связей с организмом можно использовать лишь в острых опытах.

Методы окошечек. Для продолжительных, повторяющихся наблюдений используют различные модификации, предложенные Сэндисоном (J. C. Sandison, 1924), так называемые методы окошечек. При этом сквозное отверстие, сделанное в ухе кролика (или в складке кожи), с обеих сторон плотно закрывают тонкими стеклянными (или иными прозрачными) пластинками. В пространство между пластинками прорастает окружающая соединительная ткань с сосудами, что можно наблюдать, помещая «окошечко» под микроскоп. С помощью этого метода были сделаны важные наблюдения над развитием и функцией мелких тканевых сосудов и капилляров, поведением трансплантатов различных органов и т. д.

Естественной прозрачной средой для прижизненных микроскопических наблюдений за теми или иными тканями может служить передняя камера глаза животных, в которую имплантируют изучаемую ткань. Так, в передней камере глаза удалось наблюдать первые стадии развития оплодотворенного яйца мыши, циклические изменения в кусочке трансплантированного эндометрия обезьяны (Блум и Фоситт, 1968), реактивные изменения имплантатов скелетной мышечной ткани и т. д.

Методы микроургии. Важное место среди приемов исследования живых клеток и тканей занимают методы микроургии, т. е. совокупность методических приемов, дающих возможность производить разнообразные операции над помещенными в питательную среду очень мелкими и микроскопическими объектами – простейшими, клетками или комплексами клеток многоклеточных животных, яйцами иглокожих, земноводных, зародышами, внутриклеточными структурами и т. п. В зависимости от размеров объекта операции производят вручную или с помощью специальных микроманипуляторов). С их помощью можно производить пересадки ядер и ядрышек, введение в изолированные клетки различных веществ, подведение к клеточным мембранам микроэлектродов и т. д.

Для локального разрушения микроструктур клеток, например, ядрышек используют сфокусированный пучок ультрафиолетовых лучей («лучевой микроукол») – прием, впервые предложенный С.С. Чахотиным в 1912 г.

Использование методов прижизненных наблюдений ограничивается значительными техническими трудностями, связанными со свойствами тканей: непрозрачность, оптическая однородность и т. д., с повреждающими воздействиями освещения (особенно ультрафио-

летовыми лучами и др.), токсическим действием красителей и т. п. Вследствие этого при исследовании живых и переживающих объектов, следует особенно тщательно подбирать специальные методы микроскопического исследования в каждом случае.

7.2. Методы микроскопии, применяемые для витального исследования

Способом улучшения условий микроскопического наблюдения над живыми объектами является прижизненное окрашивание их специальными красителями (*витальная окраска*), позволяющее изучить детали строения микроскопических объектов и исследовать некоторые их физиологические свойства.

Для витального исследования могут быть применены следующие методы микроскопии:

1. *Микроскопия в темном поле (темнопольная микроскопия)* основана на явлении рассеивания света на границе двух объектов с разными показателями преломления (например, ядро и цитоплазма).

2. *Фазово-контрастная микроскопия и интерференционная микроскопия* основаны на свойстве биологических структур, прозрачных для видимого света, изменять фазу проходящих через них лучей. Поскольку в разных участках объекта, отличающихся показателем преломления и толщиной, эти изменения неодинаковы, биологические структуры становятся видимыми.

3. *Поляризационная микроскопия* основана на свойстве анизотропии (двойного лучепреломления) структур в клетках и тканях и применяется главным образом для выявления и идентификации некоторых кристаллических веществ и липидов, а также поперечно-полосатых мышц, коллагена, миелина и т. д.

4. *Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия* основана на регистрации флюоресцирующих веществ, дает возможность наблюдать клетки и ткани при освещении (возбуждении) ультрафиолетовыми или сине-фиолетовыми лучами.

Люминесцентный микроскоп со стеклянной оптикой позволяет наблюдать флюоресценцию в видимой части спектра, ультрафиолетовый флюоресцентный микроскоп с кварцевой оптикой используют для изучения невидимой ультрафиолетовой флюоресценции путем ее фотографической или фотоэлектрической регистрации. С помощью люминесцентных микроскопов можно наблюдать собственную

флюоресценцию содержащихся в тканях веществ, например, витаминов А, В₂, некоторых пигментов.

5. *Ультрафиолетовая микроскопия* основана на абсорбции ультрафиолетовых лучей химическими структурами клеток (белки, нуклеиновые кислоты).

Этот метод применим для прижизненных наблюдений, однако наибольшее распространение он нашел в количественной цито- и гистохимии – *метод абсорбционной цитоспектрофотометрии*.

7.3. Гистологическая техника: прижизненная фиксация материала

Помимо фиксации кусочков органов и тканей в фиксирующих жидкостях, существует метод прижизненной фиксации органов или целого организма пропусканием (перфузией) фиксатора через кровеносные сосуды. Этот способ особенно ценен для исследований, при которых требуется максимально сократить время между прекращением жизнедеятельности исследуемого объекта и началом фиксации (некоторые гистохимические и гистологические методы), а также зафиксировать целиком крупный орган или весь организм.

Для этих целей необходимо взять две бутылки, имеющие выпускные приспособления внизу (емкость сосудов подбирается в зависимости от размеров объекта). На отводные стеклянные трубочки, выступающие из нижних пробок, надевают резиновые трубки, которые натягивают на ответвления тройника. Желательно, чтобы ветви тройника имели краны; если же их нет, то нужно приспособить зажимы к трубкам. На оставшуюся свободной (отводящую) ветвь тройника также надевают резиновую трубку, соединенную со стеклянной канюлей (размер канюли подбирают в зависимости от диаметра сосуда).

Одну из бутылей наполняют изотоническим раствором хлорида натрия, другую – фиксирующей жидкостью. Обе бутылки закрепляют в штативе на высоте, достаточной для обеспечения нужного давления жидкости (рис. 177). В случае надобности бутылки можно снабдить манометром и грушей для нагнетания воздуха.

Когда система подготовлена, ее заполняют, обращая особое внимание на то, чтобы нигде не было пузырьков воздуха, так как они могут закупорить сосуд и нарушить прохождение фиксатора.

Лишь по окончании всей подготовительной работы животному дают наркоз, привязывают к станку и обнажают оперативным путем

артерию и вену подлежащего фиксации органа. Артерию берут на две шелковые нити, приподнимают, надрезают стенку маленькими остро-конечными кривыми ножницами и вводят канюлю по ходу кровотока.

Закрепив ее с помощью одной из нитей, вскрывают вену и, открыв кран, начинают пропускать изотонический раствор хлорида натрия (периферический конец артерии перевязывают оставшейся второй ниткой). Как только из вены вместо крови появится светло-розовая жидкость, введение изотонического раствора хлорида натрия прекращают и начинают вводить фиксирующую жидкость до тех пор, пока она не начнет вытекать из вены. После этого перевязывают вену и, когда ток жидкости из бутылки прекратится, перевязывают артерию. Затем извлекают орган и кладут в фиксирующую жидкость. Если нужно фиксировать животное целиком, то наливку производят через аорту или левый желудочек сердца.

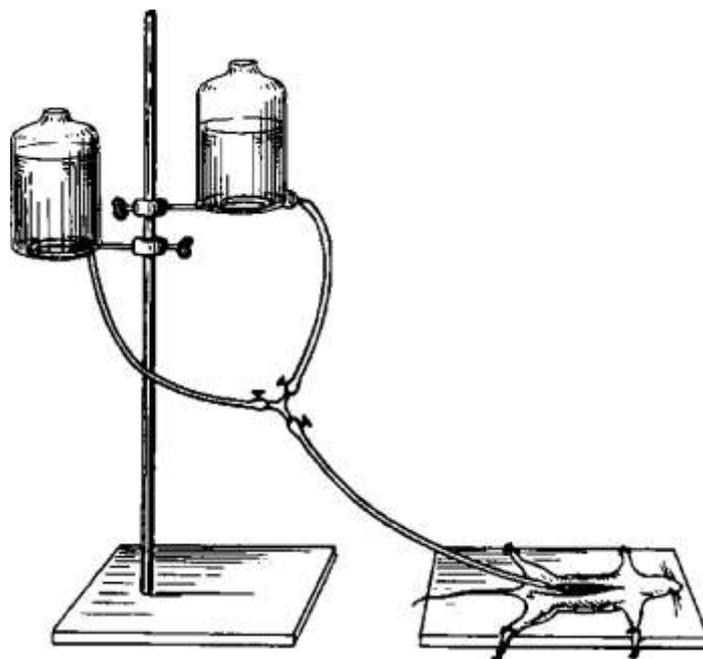


Рисунок 177 – Приспособление для прижизненной фиксации с помощью перфузии фиксирующих жидкостей через кровеносные сосуды

Важным моментом является переключение системы с изотоническим раствором хлорида натрия на фиксирующую жидкость. Раннее переключение приводит к фиксации сосудов, заполненных кровью, что служит препятствием к дальнейшему прохождению фиксатора, позднее вызовет нарушение проницаемости сосудистых стенок и отек тканей.

Метод прижизненного или витального окрашивания клеток и тканей

Экспериментальным животным в кровяное русло или в брюшную полость вводят красители, а затем исследуют их локализацию в клетках и тканях. Следовательно, при помощи этого метода исследуют структуры в живых клетках и изучают процессы их жизнедеятельности. Наиболее распространенными витальными красителями являются *трипановый синий, нейтральный красный, нильский синий*, которые употребляют в больших разведениях – 1:1000 и более.

Прижизненная (витальная) окраска тканей

Описанные в предыдущих разделах методы обработки материала для микроскопического изучения органов и тканей имеют существенный недостаток: перед исследователем всегда статическое состояние объекта, зафиксированное в момент или после прекращения процессов жизнедеятельности. Естественно стремление биологов иметь на вооружении методы, позволяющие вести наблюдения за живыми органами и тканями. Такая возможность открылась с введением в практику методов прижизненной окраски исследуемого объекта.

Основные требования к прижизненным красителям: минимальная токсичность и избирательное окрашивание отдельных структурных элементов клеток и тканей. Зная особенности распределения в тканях тех или иных красителей при нормальном функционировании организма, можно определить различные отклонения, наступающие при тех или иных патологических состояниях. Значительную помощь оказывают витальные красители в эмбриологических исследованиях при изучении развития, так как можно успешно вести наблюдения за перемещением окрашенных клеток. Сказанное в полной мере относится и к изучению тканевых культур (выращивание кусочков органов и тканей на специальных питательных средах).

Как и обычные гистологические красители, все красители для прижизненной окраски разделяют:

- на *основные*;
- *кислотные*;
- *нейтральные*.

Основные красители воспринимаются почти всеми клетками, но особенно хорошо клетками и структурами, богатыми липоидами. Именно последнее свойство обеспечивает хорошее прижизненное окрашивание основными красителями нервной ткани.

Кислотные красители окрашивают лишь некоторые виды клеток и в первую очередь клетки ретикулоэндотелиальной системы, обладающие высокой фагоцитарной активностью. Эти клетки играют важную роль в защитной реакции организма. Их способность накапливать прижизненно частицы кислотных красителей позволяет широко применять витальное окрашивание для изучения их функционального состояния. К таким красителям относят трипановый синий, тушь, литиевый кармин.

Существуют различные способы применения витальных красителей. Крупным лабораторным животным красящие растворы вводят путем внутривенных, внутрибрюшинных или подкожных инъекций, причем скорость окраски зависит от способа введения (наибольшая – при внутривенном, наименьшая – при подкожном). Лягушкам краситель вводят в спинной лимфатический мешок или брюшную вену. Окраску мелких водных животных производят подкрашиванием воды в аквариуме.

Применяют также метод введения красителя через рот, подмешивая его в пищу. Обычно красители растворяют в дистиллированной воде или изотоническом растворе хлорида натрия. Однако самым идеальным растворителем является сыворотка крови соответствующего животного, обеспечивающая лучшее всасывание красителя. Для получения такого раствора в стерильных условиях приготавливают 1 %-й сывороточный раствор соответствующего красителя, центрифугируют его (3000–3500 об/мин) и отсасывают надосадочную фракцию пипеткой.

Освоение техники витального окрашивания наиболее удобно в процессе окраски соединительной ткани белых крыс (или мышей) трипановым синим.

Приготовление раствора

Растворяют 1 г трипановой сини в 100 мл изотонического раствора хлорида натрия (или дистиллированной воды). Годность раствора при хранении в прохладном месте – 3–4 нед. Перед употреблением раствор красителя фильтруют, стерилизуют (кипячением в течение 10–15 мин) и дают остыть до 25–35 °С. Одновременно стерилизуют двухграммовый шприц и иглы.

Подкожная инъекция. Помощник захватывает корнцангом кожу подопытной крысы на затылке, а второй рукой берет животное за кончик хвоста и растягивает на столе спинкой кверху. Эксперимента-

тор, набрав в шприц раствор красителя (из расчета 0,5 мл на 20 г массы тела), свободной рукой оттягивает кожу на спине (или на боковой поверхности тела животного) и, воткнув под кожу иглу, вводит краситель.

Введение внутрибрюшинно. Помощник берет крысу так же, как в предыдущем эксперименте, но вытягивает ее вертикально вниз головой. При таком положении тела происходит перемещение органов брюшной полости к диафрагме, что позволяет легко проникнуть в брюшную полость без повреждения внутренностей. Иглу вводят в левую нижнюю половину стенки живота под острым углом (сверху вниз). Способ более быстрый и простой, чем привязывание за лапки в положении на спине. Концентрация и количество красителя те же, что и при подкожном введении.

Внутривенное введение. Можно производить в хвостовую или яремную вены, предварительно привязав крысу в специальном станке брюшком кверху. Количество красителя вдвое меньше, чем при двух предыдущих способах, концентрация та же. При удачной однократной внутривенной инъекции хорошее окрашивание наступает уже через 24 ч, при внутри брюшинной – через 48 ч. Подкожное введение обычно повторяют несколько раз через 3–4 дня. Наступление общего окрашивания легко определить по посинению слизистых оболочек и радужки глаз. Общее посинение кожных покровов наступает несколько позднее.

Животное забивают одним из принятых способов (декапитация, эфир или хлороформ), производят вскрытие и берут подлежащие исследованию органы и ткани.

Фиксация. Фиксация отложившегося в тканях трипанового синего лучше всего наступает при применении сложных фиксаторов – Буэна, Штива и др. Однако, если таковые отсутствуют, можно применять и формалин. При этом следует иметь в виду, что нежные гранулы Пробные препараты можно приготовить из срезов, полученных на замораживающем микротоме. Обычно же материал заливают в парафин, приготавливают срезы толщиной 5–7 мкм и подкрашивают: при применении трипанового синего (или туши) – кармином или нейтральным красным, при применении литиевого кармина – метиленовым синим и др. Затем обезвоживают, просветляют и заключают в бальзам.

Контрольные вопросы

1. Укажите наиболее распространенные способы микроскопического изучения живых объектов.
2. В чем заключается метод культивирования тканей вне организма? Укажите его основные преимущества и недостатки.
3. Какие условия необходимы для культивирования тканей вне организма?
4. Каковы типы роста тканевых культур?
5. В каких случаях и для чего прибегают к культивированию клеток в диффузионных камерах?
6. Кто впервые предложил использование метода окошечек? С какой целью его используют?
7. Каким образом осуществляют прижизненную фиксацию материала?
8. Перечислите основные методы и окрашивание витального материала. Какие красители чаще всего используют для витальной окраски?

ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

ТЕМА 1. ВВЕДЕНИЕ.

ПОНЯТИЕ О МОРФОЛОГИИ И ПАТОМОРФОЛОГИИ

1. Комплекс наук, изучающих форму и строение организмов в их онто- и филогенезе – это _____.

2. Дисциплины, являющиеся составляющими морфологии, как комплексной науки – это (все верно, кроме):

- 1) анатомия;
- 2) гистология;
- 3) цитология;
- 4) эмбриология;
- 5) оперативная хирургия;
- 6) патологическая анатомия.

3. Медицинская наука, изучающая патологические процессы и болезни, а также изменения, возникающие в клетках и тканях организма, органах и системах органов с помощью научных морфологических методов исследования – это _____.

4. Основные задачи патологической анатомии – это (все верно, кроме):

- 1) исследование патоморфоза заболеваний;
- 2) изучение ятрогений;
- 3) разработка вопросов теории диагноза;
- 4) изучение морфологии и свойств возбудителей инфекционных болезней;
- 5) прижизненная и посмертная диагностика патологических процессов при помощи морфологических методов.

5. Стойкое и закономерное изменение картины болезни под влиянием условий жизни или лечения – это _____.

6. Установите соответствие между термином и его определением:

- | | |
|--------------------------|---|
| 1) болезнь; | а) патологический процесс, характеризующийся общностью этиологии, патогенеза, клинических, типичных внешних проявлений (морфологических) и характерного поражения органов и тканей, а также подходов к его лечению; |
| 2) нозологическая форма; | б) механизм умирания (смерти); |
| 3) танатогенез; | в) механизм выздоровления; |
| 4) реконвалесценция; | г) состояние организма, выраженное в нарушении его нормальной жизнедеятельности, продолжительности жизни, и его способности поддерживать свой гомеостаз. |

7. Установите последовательность этапов методов морфологического исследования:

- 1) этап практической реализации;
- 2) эмпирический этап;
- 3) теоретический этап.

8. Установите соответствие между видом морфологического исследования и его сущностью:

- | | |
|---|--|
| 1) гистохимический метод; | а) метод изучения биологических структур без значительного увеличения объекта; |
| 2) макроморфологический метод; | б) метод выявления различных химических веществ и продуктов их метаболизма в тканях с помощью дифференциального окрашивания; |
| 3) микроморфологический (микроскопический) метод; | в) метод микроскопического исследования, основанный на обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу; |
| 4) иммуногистохимический метод; | г) метод морфологического исследования, осуществляющийся с помощью специальных приборов (микроскопа), значительно увеличивающих изображение объекта. |

9. Установите соответствие между этапом морфологического исследования и его сущностью:

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1) теоретический этап; | а) получение первичной информации об объекте от органов чувств; |
| 2) этап практической Реализации; | б) этап осмысления полученных эмпирических данных и их систематизации; |
| 3) эмпирический этап; | в) использование результатов исследования в практической деятельности. |

ТЕМА 2. ПАТОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ВСКРЫТИЕ ТРУПОВ ЖИВОТНЫХ

1. Основной метод исследования, применяемый в патологической анатомии для изучения патологических процессов, болезней и определения причины смерти животного – это _____.

2. Специалисты, имеющие право проводить патолого-анатомическое вскрытие трупов животных:

- 1) зоотехник;
- 2) ветеринарный санитар;
- 3) скотник или доярка;
- 4) ветеринарный врач или фельдшер;
- 5) руководитель хозяйства или его заместитель.

3. Специальное помещение, в котором проводят патолого-анатомическое вскрытие трупов животных, оборудованное соответствующим образом – это _____.

4. Проведение патолого-анатомического вскрытия трупов животных в животноводческих помещениях:

- 1) строго запрещено;
- 2) разрешено;
- 3) разрешается в случае отсутствия других помещений;
- 4) разрешается при наличии бетонного покрытия пола.

5. Правила, по которым конструируется и оборудуется секционный зал:

- 1) произвольные, на усмотрение ветеринарного специалиста;
- 2) принятые для хирургических операционных;
- 3) принятые для любых животноводческих помещений;
- 4) принятые для ветеринарных лабораторий.

6. Соотношение площади окон к площади пола в прозектории должно составлять: _____.

7. Нормы температуры воздуха в секционном зале:

- 1) не ниже 10 °С;
- 2) 5 °С;
- 3) 20 °С;
- 4) 0 °С.

8. Особенности конструкции столешницы секционного стола – это _____.

9. Место для проведения вскрытия трупов животных, в случае отсутствия специальных помещений для секции:

- 1) скотомогильник;
- 2) животноводческое помещение;
- 3) площадка для выгула животных;
- 4) любое другом помещении.

10. Одежда, в которой проводится секция трупов животных:

- 1) повседневная одежда ветеринарного специалиста;
- 2) халат и колпак ветеринарного специалиста;
- 3) любая спецодежда;
- 4) халат, колпак и патолого-анатомические перчатки.

11. Длина фартука, надеваемого поверх халата:

- 1) на 30 см длиннее халата;
- 2) на 10 см короче халата;
- 3) не ниже уровня колена прозектора;
- 4) на 3–5 см длиннее халата, фартук должен закрывать голенище обуви.

12. Правильное направление режущих движений секционным ножом или скальпелем:

- 1) от себя, слева направо;
- 2) к себе, справа налево;
- 3) зигзагообразные разрезы;
- 4) в любом направлении.

13. Порядок проведения разрезов ткани органа в том случае, если для исследования одного разреза недостаточно:

- 1) несколько разрезов в хаотичном порядке;
- 2) несколько параллельных разрезов;
- 3) несколько перпендикулярных разрезов;
- 4) несколько пересекающихся разрезов.

14. Правильный способ удерживания в руке скальпеля при проведении патолого-анатомического вскрытия трупов:

- 1) как писчее перо;
- 2) в произвольной форме;
- 3) всей ладонью;
- 4) двумя пальцами, максимально отставив мизинец в сторону.

15. Действия, которые категорически запрещены при проведении секции трупов животных:

- 1) разговоры между прозекторами;
- 2) временное прерывание процесса вскрытия;
- 3) проведение вскрытия без маски;
- 4) допуск к месту вскрытия посторонних лиц и животных;
- 5) разговоры между прозектором и вспомогательным персоналом.

16. Действия прозектора при случайном ранении во время патолого-анатомического вскрытия:

- 1) продолжить вскрытие;
- 2) полностью остановить вскрытие, продолжить на следующий день;
- 3) приостановить вскрытие, провести полную санацию раны;
- 4) приостановить вскрытие, сменить перчатки, возобновить секцию, как можно быстрее.

17. Болезнь животных, при которой проведение вскрытия трупов запрещено:

- 1) сальмонеллез;
- 2) сибирская язва;
- 3) рожа свиней;
- 4) чума свиней;
- 5) пастереллез.

18. Метод исследования, применяемый для изучения патологических процессов, болезней и определения причины смерти животного – это _____.

19. Установите последовательность действий ветеринарного врача при проведении патолого-анатомического исследования трупа животного:

- 1) наружный осмотр;
- 2) регистрация, сбор анамнестических данных;
- 3) составление патолого-анатомического диагноза;
- 4) составление патолого-анатомического заключения;
- 5) внутренний осмотр.

20. Методы вскрытия трупов это (все верно, кроме):

- 1) метод биопсии;
- 2) метод извлечения полного органокомплекса;
- 3) метод изолированного извлечения отдельных органов;
- 4) метод частичного расчленения органокомплекса.

21. Ученый, разработавший метод изолированного извлечения отдельных органов:

- 1) Георгий Владимирович Шор;
- 2) Рудольф Вирхов;
- 3) Давид Ильич Выводцев;
- 4) Николай Федотович Мельников-Разведенков;
- 5) Алексей Иванович Абрикосов.

22. Ученый, разработавший метод полной эвисцерации:

- 1) Георгий Владимирович Шор;
- 2) Рудольф Вирхов;
- 3) Николай Иванович Пирогов;

- 4) Николай Федотович Мельников-Разведенков;
- 5) Алексей Иванович Абрикосов.

23. Установите взаимосвязь между методом вскрытия и его сущностью:

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| 1) метод полной эвисцерации; | а) вскрытие части |
| 2) метод частичной эвисцерации; | или фрагментов трупа; |
| 3) метод изолированного | б) извлечение отдельных |
| извлечения отдельных органов; | органов с учетом анатомо- |
| 4) неполное (частичное) | физиологических связей; |
| вскрытие; | в) полное извлечении |
| | единого органокомплекса; |
| | г) извлечение расчлененного |
| | на несколько сегментов |
| | органокомплекса. |

24. Определите последовательность патолого-анатомического исследования при проведении наружного осмотра трупа животного:

- 1) исследование скелетной мускулатуры;
- 2) исследование суставов;
- 3) исследование состояния естественных отверстий;
- 4) исследование кожи и ее производных;
- 5) исследование общего вида трупа: телосложение, упитанность, форма живота, положение трупа.

25. Основной ветеринарно-врачебный документ о причинах смерти животного, включающий в себя описание всех обнаруженных во время патолого-анатомического исследования изменений это:

_____.

26. Определите последовательность разделов протокола патолого-анатомического вскрытия:

- 1) наружный осмотр;
- 2) результаты лабораторных исследований;
- 3) внутренний осмотр;
- 4) заключение о причине смерти животного и клинико-анатомический эпикриз;
- 5) вводная часть;
- 6) патолого-анатомический диагноз.

27. Определите соответствие между разделом протокола патолого-анатомического вскрытия и его содержанием:

- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1) вводная часть; | а) данные патолого-анатомического |
| 2) описательная часть; | исследования трупа (наружный |
| 3) заключительная часть; | и внутренний осмотр); |
| | б) патолого-анатомический диагноз, |
| | результаты лабораторных исследо- |
| | ваний, заключение о причине смерти |
| | животного и клинико-анатомический |
| | эпикриз; |
| | в) информация о трупе животного |
| | (вид, пол, возраст, кличка) анамнез, |
| | эпизоотологические данные. |

28. Последовательность расстановки патолого-анатомических диагнозов в протоколе вскрытия:

- 1) на первом месте – патолого-анатомические диагнозы, наиболее характерные для основного страдания;
- 2) в произвольной последовательности;
- 3) на первом месте – патолого-анатомические диагнозы, характеризующие ближайшую причину смерти животного;
- 4) в порядке описания;
- 5) на первом месте – патологический процесс, осложняющий основное страдание.

29. Содержание заключения протокола вскрытия:

- 1) изложение данных патолого-анатомического исследования трупа;
- 2) изложение анамнестических данных (в том числе клинических);
- 3) вывод о причине, смерти, этиологической и патолого-анатомической взаимосвязи установленных болезней и патологических изменений;
- 4) обстоятельства гибели животного;
- 5) установление виновности обслуживающего персонала.

ТЕМА 3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ И РЕСТАВРАЦИЯ ВЛАЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ

1. Подготовка препарата перед помещением его в фиксирующую среду – это (все верно, кроме):

- 1) органы и ткани тщательно промывают в проточной воде;
- 2) объект тщательно препарируют и придают желательное для демонстрации положение;
- 3) различные полости, трубчатые образования, каналы и свищи заполняют сухой ватой, ставят деревянные или стеклянные распорки;
- 4) куски кожи, твердую мозговую оболочку, трубчатые органы расправляют, растягивают и закрепляют с помощью лигатур или игл.

2. Временная экспозиция, после истечения которой нельзя осуществлять значительных исправлений в фиксируемом препарате:

- 1) 10 суток;
- 2) 15 суток;
- 3) 7 суток;
- 4) 1–2 суток;
- 5) 3–4 суток.

3. Условия, соблюдение которых является необходимым для достижения положительных результатов фиксации препарата:

- 1) объем фиксирующей жидкости должен в 5–10 раз превышать объем препарата;
- 2) недопущение контакта фиксируемых препаратов со стенками посуды;
- 3) препарат должен лежать в жидкости совершенно свободно;
- 4) фиксирующая жидкость должна быть совершенно прозрачной, при ее помутнении или загрязнении необходимо заменить ее на свежую;
- 5) препараты, всплывающие на поверхность жидкости, протирают этиловым спиртом (96 %-м).

4. Установите соответствие между видом фиксирующей жидкости и ее составом:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1) Н.Ф. Мельникова-Разведенкова; | а) формалин – 200 мл; азотнокислый калий (селитра) – 15 г; уксуснокислый калий – 30 г; |
| 2) Кайзерлинга; | вода – 1000 мл; |
| 3) Пика; | б) формалин – 50 мл; карлсбадская соль (искусственная) – 50 г; вода – 1000 мл; |
| 4) Йореса; | в) формалин – 100 мл; сернокислый натрий – 20 г; сернокислая магнезия – 20; поваренная соль – 10; вода – 1000 мл; |
| | г) формалин – 100 мл; хлористый калий – 5 г; уксуснокислый калий (или натрий) – 30 г; вода – 1000 мл. |

5. Вещество, в которое переходит гемоглобин крови при фиксации препарлируемых органов и тканей в формалино-солевой смеси:

- 1) сернистое железо;
- 2) порфирин;
- 3) метгемоглобин;
- 4) вердоглобин;
- 5) биливердин.

6. Факторы, от которых зависит время пребывания препаратов в формалино-солевом растворе:

- 1) величина и плотность тканей фиксируемого объекта;
- 2) количество и глубина сделанных разрезов и надрезов тканей фиксируемого объекта;
- 3) свежесть и крепость фиксатора;
- 4) температурный режим;
- 5) интенсивность освещения.

7. Признаки достаточной фиксации объекта:

- 1) равномерное уплотнение объекта;
- 2) отсутствие на контрольном разрезе красноватых и розовых участков;
- 3) поверхность объекта приобретает серую окраску;
- 4) с поверхности разреза не выдавливается кровянистой жидкости.

8. Желательная температура помещения, в котором проводится фиксация объектов:

- 1) +18 °С;
- 2) +25 °С;
- 3) +30 °С;
- 4) 0 °С;
- 5) –5 °С;

9. Установите последовательность этапов восстановления естественной окраски фиксированного препарата:

- 1) после восстановления естественной окраски обработку спиртом прекращают;
- 2) объект промывают в проточной водопроводной воде;
- 3) объект помещают в емкость с крепким (90–96 %-м) спиртом.

10. Установите соответствие между видом глицериновой смеси для хранения влажных препаратов и ее составом:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1) Н.Ф. Мельникова- Разведенкова; | а) поваренная соль – 100 г; кипяток (крутой) – 1000 мл; |
| 2) Кайзерлинга; | растворяют, фильтруют и добавляют: |
| 3) Г.В. Шора; | спирт 96 %-й – 150 мл; |
| 4) Иореса; | глицерин – 1000 мл; |
| | б) вода – 1000 мл; |
| | уксуснокислый калий (или натрий) – 400 г; |
| | глицерин – 600 мл; |
| | в) глицерин – 500 мл; |
| | вода 50 мл; |
| | г) вода – 1000 мл; |
| | уксуснокислый калий – 200–800 г; |
| | глицерин – 200–350 мл. |

ТЕМА 4. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Методы, применяемые для изучения строения и функций клеток и тканей растительных и животных организмов в норме, патологии и в эксперименте – это _____.

2. Специальные методы микроскопирования – это (все верно, кроме):

- 1) фазово-контрастная микроскопия;
- 2) темнопольная микроскопия;
- 3) световая микроскопия;
- 4) ультрафиолетовая микроскопия;
- 5) поляризационная микроскопия.

3. Установите соответствие между видом микроскопического исследования и его сущностью:

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1) фазово-контрастная микроскопия; | а) основана на абсорбции ультрафиолетовых лучей химическими структурами клеток: белки, нуклеиновые кислоты; |
| 2) темнопольная микроскопия; | б) основана на регистрации флюоресцирующих веществ; |
| 3) люминесцентная микроскопия; | в) основана на явлении рассеивания света на границе двух объектов с разными показателями преломления; |
| 4) ультрафиолетовая микроскопия; | г) основана на свойстве анизотропии (двойного лучепреломления) структур в клетках и тканях; |
| 5) поляризационная микроскопия; | д) основаны на свойстве биологических структур, прозрачных для видимого света, изменять фазу проходящих через них лучей. |

4. Специальные (немикроскопические) методы исследования строения и функций клеток и тканей – это (все верно, кроме):

- 1) автордиография;
- 2) трансмиссионная микроскопия;
- 3) рентгеноструктурный анализ;
- 4) микроургия;
- 5) ультрацентрифугирование.

5. Установите соответствие между специальным видом исследования функций клеток и тканей и его сущностью:

- | | |
|---|--|
| 1) цито- или гистохимия; | а) фракционирование клеток или субклеточных структур путем центрифугирования в растворах различной плотности; |
| 2) цитофотометрия; | б) использование строго специфических химических реакций со светлым конечным продуктом в клетках и тканях для определения количества различных веществ: белков, ферментов, жиров, углеводов и т. д.; |
| 3) морфометрия; | в) «выращивание» клеток и клеточных культур в питательных средах или в диффузионных камерах, имплантированных в различные ткани организма; |
| 4) метод культивирования клеток и тканей; | г) применяется в комплексе с цито- или гистохимией и дает возможность количественно оценить выявленные цитогистохимическим методом белки, ферменты и т. д.; |
| 5) ультрацентрифугирование; | д) измерение размеров биологических структур на клеточном и субклеточном уровне. |

6. Установите соответствие между основными характеристиками светового микроскопа и их сущностью:

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1) разрешающая способность; | а) различие яркостей изображения и фона; |
| 2) контраст изображения; | б) используется для выражения разрешающей способности оптической системы или светосилы объектива; |
| 3) увеличение микроскопа; | в) минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом отдельно; |
| 4) числовая апертура; | г) интенсивность света, приходящаяся на единицу площади изображения, приблизительно равна квадрату NA. |
| 5) светосила объектива; | д) произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. |

7. К механической части относят следующие составляющие (все верно, кроме):

- 1) штатив;
- 2) тубус с револьвером для крепления и смены объективов;
- 3) предметный столик для препарата;
- 4) приспособления для крепления конденсора и светофильтров;
- 5) окуляры.

8. К оптической части относят следующие составляющие (все верно, кроме):

- 1) объективы;
- 2) осветительная система;
- 3) зеркало;
- 4) механизмы для грубого и тонкого (перемещения предметного столика или тубусодержателя);
- 5) окуляры.

9. Метод микроскопии, при котором вместо света используют поток электронов, стеклянные линзы заменены электромагнитными полями, максимальное увеличение 1,5 млн раз, не требует окраски препарата – это _____.

10. Установите соответствие между специальным немикроскопическим методом исследования гистологических препаратов и его сущностью:

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1) гисторентгенография; | а) метод регистрации радиоактивного распада в тканевых, клеточных структурах фотографическим способом; |
| 2) рентгеноструктурный анализ; | б) метод основанный на исследовании поглощения рентгеновских лучей структурами микробъектов; |
| 3) автогисторадиография; | в) в основе метода лежит явление дифракции рентгеновских лучей на трехмерной кристаллической решетке. |

11. Виды гистологических препаратов из фиксированных клеток (все верно, кроме):

- 1) срезы органов и тканей;
- 2) мазки;
- 3) отпечатки;
- 4) пленки;
- 5) тотальные препараты;
- 6) культуры клеток и тканей.

12. Установите соответствие между видом среза органов и тканей и его толщиной:

- | | |
|------------------|----------------------|
| 1) толстые; | а) 0,5–1 мкм; |
| 2) тонкие; | б) 5–10 мкм и более; |
| 3) полутонкие; | в) 0,005–0,2 мкм; |
| 4) ультратонкие; | г) 5–7 мкм. |

13. Требования, которым должны отвечать гистологические препараты (все верно, кроме):

- 1) сохранять прижизненное состояние структур;
- 2) быть достаточно тонкими и прозрачными для изучения их под микроскопом в проходящем свете;
- 3) быть контрастными, т. е., изучаемые структуры должны четко определяться под микроскопом;
- 4) должны сохраняться и использоваться для повторного изучения;
- 5) должны светиться в темноте.

14. Установите последовательность этапов подготовки гистологического материала при изготовлении препаратов:

- 1) приготовление срезов;
- 2) проводка (обезвоживание материала);
- 3) окрашивание;
- 4) заливка (уплотнение материала);
- 5) заключение срезов в консервирующую среду;
- 6) взятие и фиксация материала.

15. Этапы приготовления мазков и тотальных препаратов (все верно, кроме):

- 1) фиксация;
- 2) уплотнение материала;

- 3) окраска;
- 4) заключение в консервирующую среду.

16. Пути получения материала для гистологического препарата (все верно, кроме):

- 1) биопсия (пунктат);
- 2) хирургическая операция;
- 3) рентгеноскопия;
- 4) секционный (трупный) материал;
- 5) экспериментальный материал.

17. Простые фиксирующие жидкости (все верно, кроме):

- 1) сулема (дихлорид ртути);
- 2) гематоксилин;
- 3) этиловый спирт (80 %-й, 90 %-й, 96 %-й и 100 %-й);
- 4) формалин;
- 5) ацетон.

18. Сложные фиксирующие жидкости (все верно, кроме):

- 1) спирт-формол по Шафферу;
- 2) солевой формол;
- 3) жидкость Буэна;
- 4) спирт-эфир;
- 5) кальций-формол по Бей.

19. Этап изготовления гистологических препаратов, заключающийся в дегидратации (обезвоживании) фрагмента ткани и пропитки его парафином или целлоидином – это: _____.

20. Вещества, используемые для обезвоживания тканей при изготовлении гистологических препаратов (все верно, кроме):

- 1) этиловый спирт, 96 %-й и 100 %-й;
- 2) изопропиловый спирт, 99 %-й;
- 3) целлоидин;
- 4) ацетон;
- 5) глицерин, 60 %-й, 80 %-й и 100 %-й.

21. Этап изготовления гистологических препаратов, заключающийся в процессе создания блока, достаточно твердого, чтобы быть пригодным для резки (микротомирования) – это _____.

22. Установите последовательность действий при заливке фрагмента ткани в парафин:

1) кусочки тканей помещают в смесь 100 %-го спирта и ксилола, в ксилол, в смесь ксилола с парафином (при $t^{\circ} 37^{\circ} \text{C}$), в чистый парафин (две порции, при $t^{\circ} 55\text{--}56^{\circ} \text{C}$);

2) парафин быстро охлаждают, кусочек ткани с окружающим его парафином вырезают в виде так называемого блока;

3) кусочек ткани обезвоживают, проводя через ряд растворов спирта возрастающей крепости – от 40 до 100 %-го.

23. Вещества, используемые вместо ксилола для обезвоживания тканей при изготовлении гистологических препаратов (все верно, кроме):

1) карболовая кислота;

2) толуол;

3) бензол;

4) хлороформ;

5) касторовое масло.

24. Установите последовательность действий при заливке фрагмента ткани в целлоидин:

1) пропитывают кусочек органа или ткани спирто-эфирными растворами целлоидина возрастающей концентрации;

2) кусочек в виде блока в деревянных или пластмассовых рамках выдерживают в парах хлороформа до затвердевания целлоидина и помещают в 70 %-й спирт ;

3) обезвоженный в спиртах кусочек органа или ткани переносят в смесь 100 %-го спирта и эфира.

25. Установите соответствие между группой гистологических красителей и ее характеристикой:

1) основные красители; а) способны растворяться в определенных

2) кислые красители; ных веществах;

3) индифферентные красители; б) представляют собой красящие основания или чаще их соли, окрашивают структуры, богатые нуклеиновыми или иными кислотами;

в) красящие кислоты или их соли, окрашивают белковые компоненты цитоплазмы и неклочные структуры (коллагеновые волокна).

26. Установите последовательность техники светового микроскопирования методом светлого поля:

- 1) вращая револьвер, устанавливают объектив малого увеличения $\times 4$;
- 2) без поднятия тубуса, вращая револьвер, заменяют объектив малого увеличения ($\times 4$) на объективы большего увеличения ($\times 10$; $\times 40$);
- 3) находят правильное освещение препарата;
- 4) препарат помещают на предметный столик микроскопа и закрепляют его боковыми зажимами;
- 5) находят изображение при малом увеличении (объектив $\times 4$), фокусируя макрометрическим винтом.

27. Правила забора и фиксации материала и фиксации для гистологического исследования (все верно, кроме):

- 1) материал берут из центральной зоны патологически измененного очага и зоны, граничащей с неизмененными тканями;
- 2) иссечение кусочков тканей проводят только острым инструментом;
- 3) в случае, когда биологический материал содержит примеси крови, до помещения в фиксирующую жидкость образец необходимо промыть в 96 %-м этиловом спирте;
- 4) иссеченные фрагменты ткани должны быть плоской формы, не толще 3–5 мм;
- 5) после забора материала его сразу помещают в емкость с фиксатором.

28. Правила фиксации и отправки материала в лабораторию для гистологического исследования (все верно, кроме):

- 1) фиксирующей жидкостью для хранения и транспортировки материала является 20 %-й формалин;
- 2) соотношение объема исследуемого материала к объему формалина должно составлять не менее 1 : 10;
- 3) емкость для фиксации должна быть плотно закрыта;
- 4) при отправке в лабораторию материал сопровождают бланком-направлением;
- 5) направление на патогистологическое исследование заполняется в двух экземплярах.

29. Установите последовательность техники приготовления отпечатков:

- 1) делают несколько отпечатков на фильтровальной бумаге;
- 2) производят отпечаток органа на обезжиренном, чистом предметном стекле;
- 3) из исследуемого органа из исследуемого органа небольшой кусочек;
- 4) фиксируют и окрашивают по избранной методике;
- 5) отпечатки подсушивают при комнатной температуре.

30. Требования, которым должен отвечать мазок крови (все верно, кроме):

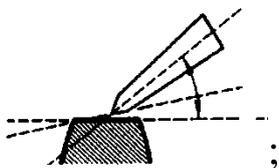
- 1) начинаться на 2 см от начала предметного стекла и заканчиваться на расстоянии 1 см от его противоположного края;
- 2) общая длина мазка должна охватывать $1/2-3/4$ стекла;
- 3) быть равномерной толщины;
- 4) быть толще всего вначале, затем постепенно истончается и заканчивается в виде следа («вид щеточки»);
- 5) слой крови не должен достигать краев стекла.

31. Установите последовательность техники приготовления мазков:

- 1) стекла промывают под проточной водой в течение 24 ч, протирают насухо и кладут в банку со смесью спирт-эфира;
- 2) предметное стекло берут в левую руку большим, указательным и средним пальцами так, чтобы капля крови была сверху;
- 3) к капле крови прикасаются предметным стеклом;
- 4) предметные стекла помещают в раствор хромпика;
- 5) предметные стекла высушивают;
- 6) шлифованное стекло ставят под углом $30-45^\circ$ на расстоянии 1–2 мм перед каплей;
- 7) сдвигают шлифованное стекло назад так, чтобы оно коснулось капли крови и капля растеклась;
- 8) быстрым движением руки вперед делают мазок.

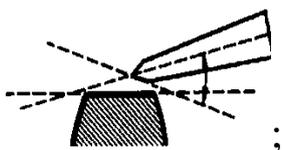
32. Установите соответствие между положением микротомного ножа и правильностью угла его наклона:

1)



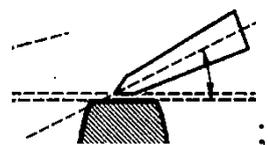
а) угол наклона слишком маленький;

2)



б) угол наклона правильный;

3)



в) угол наклона слишком большой.

33. Самый распространенный метод гистологической окраски, сочетающий применение основного и кислого красителей, позволяющий выявить клетки и внеклеточные структуры: ядра окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, цитоплазма – желтовато-розовый цвет – это:

1) окраска Суданом III;

2) окраска гематоксилином и эозином;

3) окраска Суданом IV;

4) окраска по Маллори;

5) окраска по Ван Гизону.

34. Гистологический краситель растительного происхождения, добываемый из древесины кампешевого дерева, относящийся к группе основных красителей, окрашивающий ядра клеток в фиолетовый цвет – это:

1) янус зеленый;

2) основной коричневый;

3) тианин;

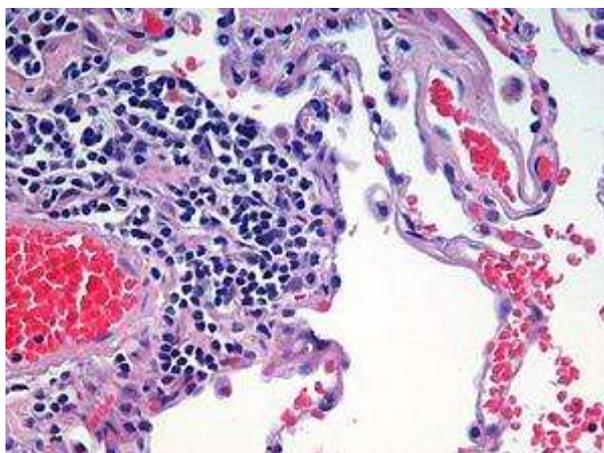
4) метиленовый синий;

5) гематоксилин.

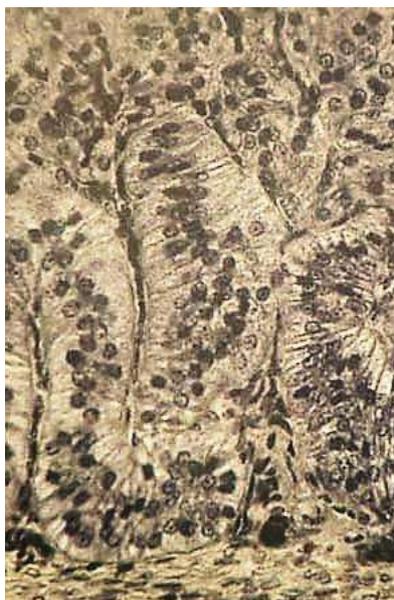
35. Протоплазматический краситель; используемый в виде спиртовых или водных растворов, относящийся к группе кислых красителей, окрашивающий ядра цитоплазму клеток и внеклеточные структуры в розовый цвет – это:

- 1) пикриновая кислота;
- 2) эозин;
- 3) конго красный;
- 4) нильский голубой;
- 5) основной фуксин.

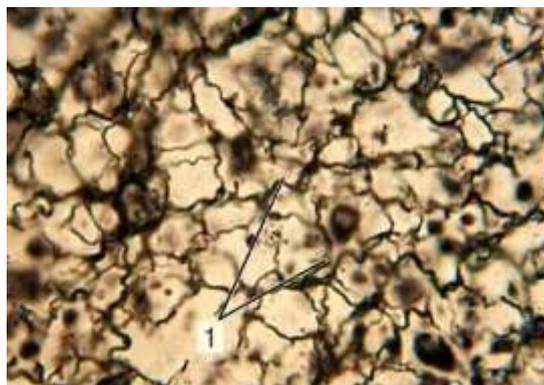
36. Определите вид гистологической окраски препарата (ткань легкого), представленного на рисунке:



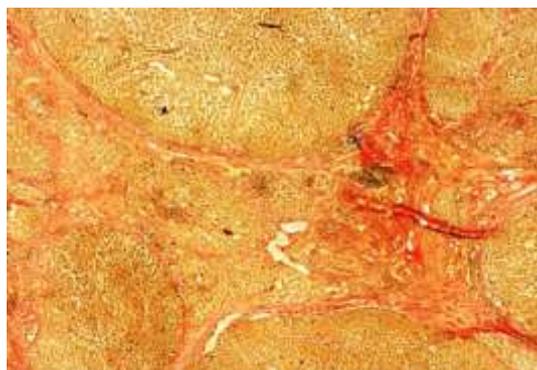
37. Определите вид гистологической окраски препарата (ткань надпочечника), представленного на рисунке:



38. Определите способ выявления внеклеточных структур соединительной ткани (ретикулярные волокна лимфатического узла), представленного на рисунке:



39. Определите способ окрашивания структур соединительной ткани (ткань печени при циррозе), представленного на рисунке:



**ТЕМА 5. ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.
МЕТОД ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ.
МЕТОД АВТОРАДИОГРАФИИ**

1. Установите последовательность окрашивания гистологических препаратов Суданом III:

1) подкрашивают ядра кислым гемалауном или гематоксилином Эрлиха;

2) срезы промывают в дистиллированной воде;

3) срезы быстро ополаскивают в 50 %-м спирте;

4) замороженные срезы (из свежей или фиксированной в формалине ткани) на несколько минут переносят из воды в 50 %-й спирт;

5) срезы промывают и заключают в желатин или глицерин-желатин;

6) замороженные срезы помещают в спиртовой раствор красителя на 15–30 мин.

2. Результат окраски срезов тканей Суданом III:

- 1) нервные волокна – черные;
- 2) гемосидерин – ярко-голубого цвета;
- 3) жировые вещества интенсивно оранжево-красного цвета, ядра – синие;
- 4) ядра – синие, цитоплазма – розовая;
- 5) амилоид – красного цвета.

3. Группа веществ, выявляемая с помощью методики окраски Суданом III:

- 1) гликоген;
- 2) жиры и жироподобные вещества в клетках и тканях;
- 3) амилоид;
- 4) гемосидерин;
- 5) билирубин.

4. Цели использования трехцветной окраски по Маллори:

- 1) окрашивание нервных волокон;
- 2) выявление аргентофильных гранул и меланина;
- 3) исследования ядер клеток;
- 4) исследование волокнистых структур соединительной ткани;
- 5) выявление выпавших в ткани солей кальция.

5. Красители, применяемые при окраске по Маллори (все верно, кроме):

- 1) анилиновый синий;
- 2) эозин;
- 3) кислый фуксин;
- 4) оранжевый «Ж».

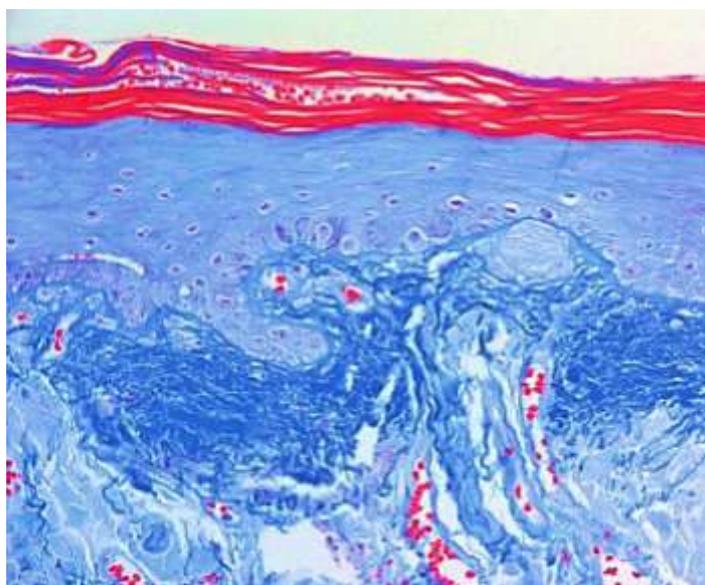
6. Гистохимический метод, используемый для выявления в тканях соединений железа:

- 1) окраска берлинской лазурью;
- 2) окраска по методу Фонтана-Массон;
- 3) окраска по Гимзе;
- 4) трехцветная окраска по Массону;
- 5) пентахромная окраска по Мовату.

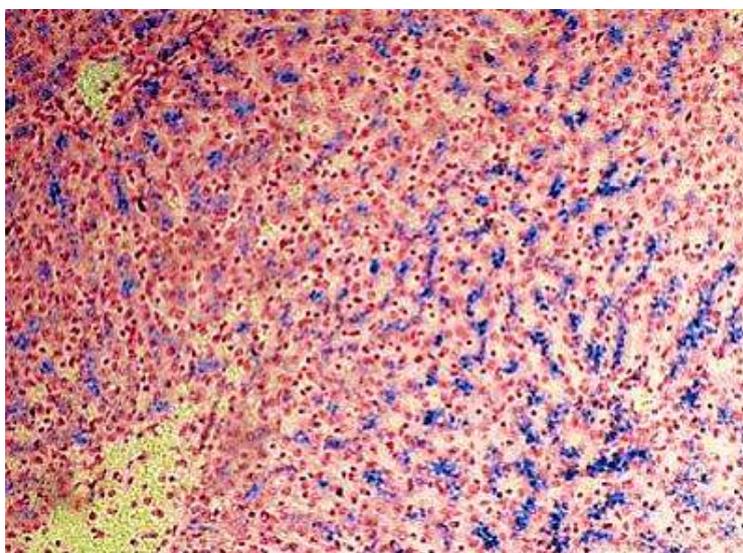
7. Реактивы, применяемые при гистохимической окраске по Маллори (все верно, кроме):

- 1) желтая кровяная соль, 2 %-й раствор;
- 2) 1 %-й раствор HCl;
- 3) метиловый спирт;
- 4) солянокислый спирт;
- 5) 1 %-й раствор фосфорно-молибденовой кислоты.

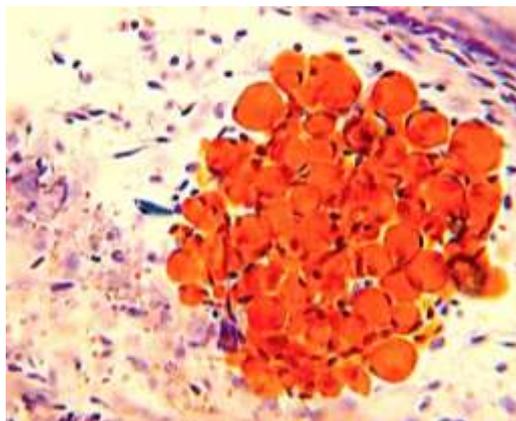
8. Определите способ окрашивания структур соединительной ткани в срезе кожных покровов, представленном на рисунке:



9. Определите способ гистохимического окрашивания среза ткани печени, представленного на рисунке:



10. Определите способ окрашивания жировой ткани в срезе мягких тканей области щеки, представленном на рисунке:



11. Методы, с помощью которых изучают локализацию различных химических веществ и продуктов их метаболизма в тканях и клетках – это _____.

12. Установите соответствие между видом количественного гистохимического метода исследования и его сущностью:

- | | |
|-----------------------------|---|
| 1) цитоспектрофотометрия; | а) позволяет оценить сухую массу и концентрацию плотных веществ в живой и фиксированной клетках; |
| 2) цитоспектрофлюориметрия; | б) метод изучения химического состава клетки, основанный на избирательном поглощении теми или иными веществами лучей с определенной длиной волны; |
| 3) интерферометрия; | в) метод количественного изучения внутриклеточных веществ по спектрам их флюоресценции или по интенсивности флюоресценции при облучении препарата заранее выбранной длиной световой волны (цитофлюориметрия). |

13. Морфологический метод, позволяющий исследовать топографию в клетках и тканях сложных биологических веществ, как эндогенного, так и экзогенного происхождения, наделенных индивиду-

ально специфической структурой – белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот и другими, – это _____.

14. Установите соответствие между видом морфологический метод метода исследования и его сущностью:

- | | |
|--|---|
| 1) метод гибридом; | а) позволяет исследовать топографию в клетках и тканях сложных биологических веществ, наделенных индивидуально специфической структурой. Продукты реакции окрашивают флюоресцирующими красителями и выявляют в люминесцентном микроскопе; |
| 2) иммунофлюоресцентный метод; | б) применяют для изучения процессов дифференцировки клеток, выявления в них специфических химических соединений и структур; |
| 3) метод иммуногистохимического анализа; | в) позволяет получать моноклональные антитела с одинаковой специфичностью которые используют для изучения антигенов как на световом, так и на ультраструктурном уровнях с помощью электронного микроскопа. |

15. Метод изучения распределения радиоактивных веществ в исследуемом объекте наложением на объект чувствительной к радиоактивным излучениям фотоэмульсии, дает возможность наиболее полно изучить обмен веществ в разных структурах – это _____.

ТЕМА 6. БИОПСИЯ: ВИДЫ, ПРАВИЛА ЗАБОРА БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Метод исследования, при котором проводится прижизненный забор клеток или тканей (биоптата) из организма с диагностической или исследовательской целью – это _____.

2. Группы биопсийных игл, применяемых в клинической практике (все верно, кроме):

- 1) режущие;
- 2) аспирационные;
- 3) тупоконечные;
- 4) модифицированные.

3. Основные виды биопсий (все верно, кроме):

- 1) аспирационная;
- 2) эксцизионная;
- 3) инцизионная;
- 4) пункционная;
- 5) витальная.

4. Установите соответствие между видом биопсии и ее характеристикой:

- | | |
|---|---|
| 1) трепан-биопсия; | а) для взятия материала используются специальные биопсийные щипцы – форцепты; |
| 2) щипковая биопсия; | б) забор тканей с помощью коагулятора, представляющего собой тонкую проволочную петлю; |
| 3) петлевая (электрохирургическая) биопсия; | в) взятие материала путем срезания тонкого слоя тканей с поверхности образования; |
| 4) скарификационная биопсия; | г) взятие материала, преимущественно, кожи с помощью специального трубчатого скальпеля; |
| 5) панч-биопсия; | д) для анализа берут столбик плотной ткани. |

5. Метод взятия патологического материала в виде тканевого столбика с помощью специальной иглы на подобии гарпуна и биопсийного пистолета – это _____.

ТЕМА 7. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ

1. Методы исследования живых клеток и тканей в культуре клеток (все верно, кроме):

- 1) суспензионные культуры;

- 2) трансплантация;
- 3) монослойные культуры;
- 4) культивирование *in vivo*.

2. Методы исследований живых клеток и тканей в организме (все верно, кроме):

- 1) вживление прозрачных камер;
- 2) трансплантация;
- 3) прижизненная микроскопия;
- 4) кор-биопсия.

3. Объектом прижизненного наблюдения при исследовании тканевых пленок (все верно, кроме):

- 1) брыжейка;
- 2) серозные покровы;
- 3) воздухоносные мешки птиц;
- 4) твердая мозговая оболочка;
- 5) легкие.

4. Совокупность методических приемов, дающих возможность производить разнообразные операции над помещенными в питательную среду очень мелкими и микроскопическими объектами – простейшими, клетками или комплексами клеток многоклеточных животных, яйцами иглокожих, земноводных, зародышами, внутриклеточными структурами – это _____.

5. Методы введения красящих растворов крупным лабораторным животным (все верно, кроме):

- 1) внутримышечные инъекции;
- 2) внутривенные инъекции;
- 3) внутрибрюшинные инъекции;
- 4) подкожные инъекции.

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ

ТЕМА 1. ВВЕДЕНИЕ. ПОНЯТИЕ О МОРФОЛОГИИ И ПАТОМОРФОЛОГИИ

| | |
|-----------------------------|------------------------|
| 1 – морфология | 6 – 1-г; 2-а; 3-б; 4-в |
| 2 – 5 | 7 – 2, 3, 1 |
| 3 – патологическая анатомия | 8 – 1-б; 2-а; 3-г; 4-в |
| 4 – 4 | 9 – 1-б; 2-в; 3-а |
| 5 – патоморфоз | |

ТЕМА 2. ПАТОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ВСКРЫТИЕ ТРУПОВ ЖИВОТНЫХ

| | |
|--|--------------------------------------|
| 1 – патолого-анатомическое вскрытие (секция, абдукция, аутопсия, вивисекция) | 16 – 3 |
| 2 – 4 | 17 – 2 |
| 3 – секционный зал, прозекторий | 18 – патолого-анатомическое вскрытие |
| 4 – 1 | 19 – 2; 1; 5; 3; 4 |
| 5 – 2 | 20 – 1 |
| 6 – 1:4–1:5 | 21 – 2 |
| 7 – 3 | 22 – 1 |
| 8 – бортики по краям; уклон к сточному отверстию в центре | 23 – 1-с; 2-d; 3-b; 4-а |
| 9 – 1 | 24 – 5, 4, 3, 1, 2 |

| | |
|--------|--|
| 10 – 3 | 25 – протокол патолого-анатомического вскрытия |
| 11 – 4 | 26 – 5, 1, 3, 2, 6, 4 |
| 12 – 2 | 27 – 1-с; 2-а; 3-б |
| 13 – 2 | 28 – 1 |
| 14 – 1 | 29 – 3 |
| 15 – 4 | |

***ТЕМА 3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ И РЕСТАВРАЦИЯ
ВЛАЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ***

| | |
|------------------------|-------------------------|
| 1 – 1 | 6 – 5 |
| 2 – 4 | 7 – 4 |
| 3 – 5 | 8 – 1 |
| 4 – 1-г; 2-а; 3-б; 4-в | 9 – 2, 3, 1 |
| 5 – 3 | 10 – 1-б; 2-г; 3-а; 4-в |

ТЕМА 4. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

| | |
|---|--------------------|
| 1 – гистологические методы исследования | 21 – заливка |
| 2 – 3 | 22 – 3, 1, 2 |
| 3 – 1-д; 2-в; 3-б; 4-а; 5-г | 23 – 1 |
| 4 – 2 | 24 – 3, 1, 2 |
| 5 – 1-б; 2-г; 3-д; 4-в; 5-а | 25 – 1-б; 2-в; 3-а |
| 6 – 1-в; 2-а; 3-д; 4-б; 5-г | 26 – 4, 1, 3, 5, 2 |

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 7 – 5 | 27 – 3 |
| 8 – 4 | 28 – 1 |
| 9 – метод электронной микроскопии | 29 – 3, 1, 2, 5, 4 |
| 10 – 1-б; 2-в; 3-д | 30 – 1 |
| 11 – 6 | 31 – 4, 1, 5, 3, 2, 6, 8, 7 |
| 12 – 1-б; 2-г; 3-а; 4-в | 32 – 1-в; 2-а; 3-б |
| 13 – 5 | 33 – 2 |
| 14 – 6, 2, 4, 1, 3, 5 | 34 – 5 |
| 15 – 2 | 35 – 2 |
| 16 – 3 | 36 – окраска гематоксилином и эозином |
| 17 – 2 | 37 – окраска железным гемато |
| 18 – 4 | 38 – импрегнация нитратом серебра |
| 19 – проводка | 39 – окраска по методу Ван-Гизона |
| 20 – 3 | |

ТЕМА 5. ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ. МЕТОД ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ. МЕТОД АВТОРАДИОГРАФИИ

| | |
|----------------------|-----------------------------|
| 1 – 4, 6, 3, 2, 1, 5 | 9 – окраска по Перлсу |
| 2 – 3 | 10 – окраска Суданом III |
| 3 – 2 | 11 – гистохимические методы |

| | |
|------------------------|---------------------------------|
| 4 – 4 | 12 – 2-б; 2-в; 3-а |
| 5 – 2 | 13 – иммунофлюоресцентный метод |
| 6 – 1 | 14 – 1-в; 2-а; 3-б |
| 7 – 5 | 15 – автордиография |
| 8 – окраска по Маллори | |

***ТЕМА 6. БИОПСИЯ: ВИДЫ, ПРАВИЛА ЗАБОРА
БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ***

| | |
|-------------|-----------------------------|
| 1 – биопсия | 4 – 1-д; 2-а; 3-б; 4-в; 5-г |
| 2 – 3 | 5 – кор-биопсия |
| 3 – 5 | |

***ТЕМА 7. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ***

| | |
|-------|-----------------------|
| 1 – 2 | 4 – методы микроургии |
| 2 – 4 | 5 – 1 |
| 3 – 5 | |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патологическая морфология – наука, изучающая патологические процессы и болезни, а также изменения, возникающие в клетках и тканях организма, органах и системах органов с помощью научных морфологических методов исследования. Патологическая морфология является одной из основных медицинских дисциплин и обязательна для изучения в медицинских и ветеринарных вузах. Данная наука тесно связана с такими дисциплинами, как патологическая физиология, клиническая диагностика, гистология и цитология, что делает ее сложным комплексным учебным предметом.

Основной задачей патологической морфологии является изучение механизма развития патологических процессов и характеристика морфологической картины болезни – макро- и микроморфологических признаков на научной основе с помощью специальных патоморфологических методов исследования.

Руководствуясь учебным пособием, включающим теоретический материал учебной дисциплины «Патоморфологические методы исследования», студенты могут самостоятельно изучать методы и технику проведения различных видов прижизненных и посмертных патоморфологических исследований, включая патолого-анатомическое вскрытие трупов животных, гистологические и цитологические методы.

В пособии подробно описана техника взятия патоморфологического материала, изготовления гистологических срезов и влажных препаратов, осуществления биопсии, изготовления мазков-отпечатков и мазков крови животных, а также правила оформления документации патолого-анатомического вскрытия. Материал пособия сопровождается иллюстрациями, в том числе фотографиями автора, что облегчает понимание и усвоение студентами учебного курса. Тестовые вопросы, приведенные в конце пособия, позволяют учащимся восполнить пробелы теоретических знаний, так как разнотипность тестовых заданий дает возможность проверить усвоение материала с нескольких позиций.

Данное учебное пособие способствует формированию профессиональных компетенции студентов в результате освоения учебной дисциплины «Патоморфологические методы исследования».

ЛИТЕРАТУРА

1. Боль, Б. К. Патолого-анатомическое вскрытие сельскохозяйственных животных / Б. К. Боль. – Москва: Сельхозиздат, 1950. – 264 с.
2. Вахрушева, Т. И. Патологическая анатомия: модуль 3. Секционный курс: учебное пособие / Т. И. Вахрушева; Красноярский государственный аграрный университет. – Красноярск, 2016. – 315 с.
3. Вахрушева, Т. И. Патологическая анатомия и судебно-ветеринарная экспертиза: методические указания по проведению производственной практики / Т. И. Вахрушева; Красноярский государственный аграрный университет. – Красноярск, 2015. – 91 с.
4. Вахрушева, Т. И. Техника изготовления влажных патолого-анатомических препаратов / Т. И. Вахрушева // Вестник КрасГАУ. – Красноярск, 2014. – № 9. – С. 150–152
5. Волкова, О. В. Основы гистологии с гистологической техникой / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – Москва: Медицина, 1982. – 304 с.
6. Вскрытие животных и дифференциальная патоморфологическая диагностика болезней / под редакцией М. С. Жакова, В. С. Прудникова, И. А. Онисима [и др.]. – Минск: Ураджай, 1998. – 263 с.
7. Жаров, А. В. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных / А. В. Жаров, И. В. Иванов, А. П. Стрельников. – Москва: Колос, 2000. – 400 с.
8. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2010. – 95 с.
9. Кудряшов, А. А. Патологическая диагностика инфекционных болезней собак и кошек / А. А. Кудряшов. – Санкт-Петербург, 2004. – 210 с.
10. Меркулов, Г. А. Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Ленинград: Медгиз, 1961. – 343 с.
11. Микроскопическая техника. Руководство / под редакцией Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – Москва: Медицина, 1996. – 544 с.
12. Общая патология человека / под редакцией А. И. Струкова, В. В. Серова, Д. С. Саркисова. – Москва: Медицина, 1990. – 448 с.
13. Патолого-анатомическая диагностика опухолей человека / под редакцией Н. А. Крачевского, А. В. Смоляникова, П. С. Саркисова. – Москва: Медицина, 1982. – 512 с.

14. Семченко, В. В. Гистологическая техника / В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В. Н. Ноздрин, В. Н. Артемьев. – Омск–Орел: Омская областная типография, 2006. – 290 с.

15. Струков, А. И. Патологическая анатомия / А. И. Струков, В. В. Серов. – Москва: Литтерра, 2010. – 848 с.

16. Шапиро, Н. А. Принципы цитологической диагностики злокачественных опухолей / Н. А. Шапиро. – Москва: Репроцентр, 2008. – 344 с.

17. Вскрытие трупов животных. Болезни крупного рогатого скота [Электронный ресурс] Болезни скота (официальный сайт). – URL: <http://diseasecattle.ru/vskrytie-trupov-zhivotnyx/instrumenty-dlya-vskrytiya-2.html> (время обращения 15.02.2019)

Иллюстративный материал был взят из следующих ресурсов:

1. Волкова, О. В. Основы гистологии с гистологической техникой / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – Москва: Медицина, 1982. – 304 с.

2. Из истории микроскопа / Андрей Жаров [Электронный ресурс] LiveJournal (официальный сайт). – URL: <https://andreas-zarus.livejournal.com/profile> (время обращения 17.10.2018)

3. Приготовление мазков крови унифицированным методом [Электронный ресурс] Labx.narod.ru (официальный сайт). – URL: http://labx.narod.ru/documents/prigotovlenie_mazkov_krovi.html (время обращения 21.09.2018)

ПРИЛОЖЕНИЕ

Протокол патолого-анатомического вскрытия трупа животного

От «___» _____ г.

1. Труп (вид, кличка, инв.№, возраст, порода, масть) _____
2. Принадлежащего (название хозяйства, район, населенный пункт; Ф.И.О. владельца животного) _____
3. Вскрытие произведено (дата и место вскрытия; кем и в присутствии кого: Ф.И.О., должность) _____
4. Анамнез: животное заболело (дата) _____
клинический диагноз _____
животное пало (дата) _____
5. Условие ухода, содержания, кормления _____
эпизоотическая обстановка в хозяйстве, лечебные мероприятия, обстоятельства смерти _____

Наружный осмотр

1. Положение трупа _____
2. Общий вид трупа _____
3. Покров (шерсть, перья, кожа, роговые образования кожи: рога, копыта, когти) _____
4. Естественные отверстия (глаза, уши, рот, мочеполовые органы) _____
6. Соматические лимфоузлы (подчелюстные, околоушные, верхнешейные, нижнешейные, коленной складки, надвыменные, предлопаточные) _____
7. Слюнные железы _____
8. Мышцы, связки, суставы, кости _____
9. Трупные изменения _____

Внутренний осмотр

1. *Брюшная полость* (для птиц грудобрюшная): форма и положение органов, содержимое _____
а) брюшина, сальник, брыжейка _____
б) диафрагма (купол стояния) _____
2. *Грудная полость* _____

а) форма и положение органов, содержимое _____

б) плевра _____

3. *Органы пищеварения:*

3.1. Ротовая полость (положение языка) _____

3.2. Пищевод (для птиц также зоб) _____

3.3. Желудок (жвачные: преджелудки, сычуг; птица: мышечный, железистый) _____

3.4. Тонкий кишечник _____

3.5. Толстый кишечник _____

3.6. Печень, желчный пузырь _____

3.7. Поджелудочная железа _____

4. *Мочеполовые органы:*

4.1. Почки, мочеточники _____

4.2. Мочевой пузырь _____

4.3. Органы размножения _____

5. *Органы дыхания:*

5.1. Носовая полость _____

5.2. Гортань, трахея, бронхи _____

5.3. Легкие _____

6. *Сердечно-сосудистая система:*

6.1. Перикард _____

6.2. Сердце _____

6.3. Аорта, легочные артерии, яремные и полые вены _____

7. *Кровь и органы кроветворения:*

7.1. Кровь _____

7.2. Селезенка _____

7.3. Лимфоузлы _____

7.4. Костный мозг _____

8. *Эндокринные железы:*

8.1. Щитовидная железа _____

8.2. Тимус _____

8.3. Надпочечники _____

8.4. Гипофиз _____

9. *Нервная система:*

9.1. Головной мозг _____

9.2. Спинной мозг _____

9.3. Нервные стволы, сплетения _____

Заключительная часть

1. *Специальные исследования* (бактериологические, химические, гистологические и др.) _____

2. *Патолого-анатомический диагноз:*

1) _____

2) _____

3) _____

3. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Подписи

Вскрывающие: _____

Присутствующие: _____

Дата произведенного вскрытия: _____

Выписка _____

Копия _____

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Учебное пособие

Электронное издание

Вахрушева Татьяна Ивановна

Редактор М.М. Ионина

Подписано в свет 10.10.2019. Регистрационный номер 309
Редакционно-издательский центр Красноярского государственного аграрного университета
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117
e-mail: rio@kgau.ru