

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра морфологии

МИКРОТЕХНИКА

Практикум

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета для студентов,
обучающихся по направлению Биология*

Ярославль
ЯрГУ
2013

УДК 57.086.2(076.5)

ББК Е.с.я73

М59

Рекомендовано

*Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2013 года.*

Рецензент

кафедра морфологии ЯрГУ им. П. Г. Демидова

Составитель

И. П. Комарова

М59 **Микротехника:** практикум / сост. И. П. Комарова; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль : ЯрГУ, 2013. — 60 с.

Практикум содержит описание всех этапов процесса изготовления срезов ткани (клеток) для микроскопических исследований. Последовательно знакомит с особенностями и анализом явлений и процессов, происходящих в клетке и ткани в норме и патологии, направлен на изучение органов и тканей позвоночных и беспозвоночных животных.

Предназначен для студентов, обучающихся по направлению 020400.62 Биология (дисциплина «Большой практикум», цикл Б3), очной и заочной формы обучения.

УДК 57.086.2(076.5)

ББК Е.с.я73

© ЯрГУ, 2013

Введение

Назначение дисциплины

Назначением дисциплины «Микротехника» является последовательное и систематическое рассмотрение цитологического строения и биохимических характеристик основных классов тканей, освоение приготовления гистологических препаратов. Важнейшая задача, которая при этом решается, — создание целостных представлений о тканевом строении основных органов и систем, получение навыка приготовления гистологических препаратов, ориентированных на исследование различных компонентов ткани, получение общего знания нормального гистологического строения органов, основ сравнительной гистологии. Кроме того, достаточно широко освещаются возможности современных гистологических методов в области исследования тканей и клеток. Всё это, как показывает практический опыт, мотивирует и является немаловажным аспектом для дальнейшего становления специалиста в области цитологии, гистологии, эмбриологии и эволюции ткани.

В результате изучения курса студент должен *знать*:

- основные типы тканей, их клеточное строение, биохимию;
- методы приготовления препаратов и их изучения;

уметь:

- изготавливать препараты и изучать их;
- описывать, зарисовывать и фотографировать препараты;
- производить анализ изображений, процессов.

В ходе работы студенты приобретут следующие компетенции.

Личностные — способность работать в команде, осуществлять исследовательскую деятельность в биологии и медицине, способность использовать гистологические технологии для построения индивидуальных образовательных и научных траекторий, аналитические умения для оценки компетентностей на основе освоенных знаний и навыков, формулировать проектные идеи в научной сфере при разработке экспериментов.

Инструментальные — владение методами гистологического анализа, умение использовать разные источники для поиска

профессионально значимой информации, умение осуществлять организацию научных проектов и экспериментов с использованием полученных знаний и умений, проводить начальный анализ гистологических исследований.

Профессиональные — понимание основ построения гистологического эксперимента, умение использовать инновационные средства и методы гистологии на основе изученного материала, умение выявлять необходимые и эффективные методы гистологического анализа, умение использовать современные средства и методы, понимание роли гистологии в современных биологических исследованиях, способность использовать освоенные знания и методы в научной и профессионально-исследовательской работе.

В результате изучения данного специального курса студент должен овладеть системой знаний и навыков, которые позволят ему проводить гистологические анализы в медицинских и научных лабораториях для решения фундаментальных и прикладных проблем биологии и медицины.

Задачи изучения дисциплины

Основными задачами изучения дисциплины «гистологическая техника» являются: изучение свойств основных классов тканей, установление структуры тканей, формирование у студентов представлений о свойствах и путях идентификации тканей организма, овладение методами гистологических исследований, представление о возможностях современных гистологических анализов, изучение средств и методов гистологии и приёмов их интеграции в современной науке и биологии, медицине, приобретение навыков проведения гистологических опытов (гистологическая техника: задачи и правила фиксации; промывание, обезвоживание и заливка гистологического материала; подготовка тканей для электронно-микроскопического исследования; микротомы и работа с ними; приготовление срезов; окрашивание и заключение срезов; модификации гистологических методов: гистохимия, иммуногистохимия, полимеразная цепная реакция на гистологических препаратах (ПЦР *in situ*), работы с гистологическими препаратами, лабораторными приборами), формирование навыков самостоятельной работы с учебной ли-

тературой и использование ее для решения контрольной работы, подготовки реферата.

В соответствии с модульным подходом данный курс студенты осваивают в течение четырёх месяцев: прослушивают курс лекций, участвуют в семинарах, отрабатывают практические умения на лабораторных занятиях, пишут реферат и контрольные работы. Все виды отчётов студентов оцениваются в балльно-рейтинговой системе. Оценка складывается по результатам текущей и итоговой аттестации. Сначала по 100-балльной шкале вычисляется рейтинг студента по курсу, а потом ему выставляется традиционная оценка по 5-балльной шкале. Таким образом, студент может видеть свой рейтинг по группе и качество полученной оценки.

Модульное построение программы курса позволяет организовывать систематический контроль (текущий, промежуточный и итоговый). Становление указанных компетенций в организационно-методическом плане позволяет расширить возможности самостоятельной работы студентов.

Межпредметная связь

Курс «Микротехника» содержательно связан с дисциплинами по биологическим и медицинским наукам, которые преподавались или будут преподаваться в течение обучения бакалавра ВПО «Физиология», «Биология клетки», «Основы цитологии и гистологии», «Эволюция клетки и ткани», «Человек»)

Курс, являющийся интегративным, реализует межпредметные связи со специальными дисциплинами подготовки студентов. Он создаёт условия для усиления биологических и медицинских аспектов осваиваемых дисциплин специализации.

ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Гистология — наука, изучающая строение и физиологию тканей организмов. Для исследований применяются различные методы.

Микроскопический. Гистологические и эмбриологические исследования неразрывно связаны и данным методом. Наиболее часто в этих исследованиях используется световой микроскоп. Кроме обычного светового микроскопа, в гистологии и эмбриологии используются микроскопы специального назначения:

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

Фазово-контрастные и интерференционные микроскопы с конденсором темного поля служат для исследования неокрашенных клеток и тканей. Люминесцентные микроскопы используются для исследования естественной и искусственной люминесценции клеток и тканей. Поляризационные микроскопы предназначены для исследования ультраструктуры клеток, имеющих закономерные, регулярные структуры. Электронные и растровые используются для исследования ультраструктуры клеток. Стереоскопические микроскопы дают объемное изображение объекта исследования.

Тотальный. Достаточно распространенный метод в гистологии, когда рассматриваются целые, нерасчлененные объекты, а сами препараты называются тотальными. К тотальным препаратам могут быть отнесены кровь, лимфа, половые клетки, зародыши ранних стадий развития, тонкие пленки тканей растений и животных.

Метод окрашивания. Для исследования большинства объектов в лучах проходящего света необходимо, чтобы они были тонкими, прозрачными и контрастными. Для того чтобы сделать объект тонким, его необходимо разрезать на тончайшие пластинки, которые называются гистологическими срезами. Чтобы объ-

ект сохранил по возможности прижизненное строение, его фиксируют, а для того чтобы сделать его контрастным, используют данный метод.

Метод фиксированных и окрашенных постоянных препаратов. Данный метод является основным, или классическим. Для их изготовления объект исследования погружают в фиксирующие жидкости, которые денатурируют белки и стабилизируют определенные структуры и соединения, подлежащие исследованию. Наиболее распространенным фиксатором является формалин. Он сшивает белки метиленовыми мостиками, вызывая их денатурацию. После фиксирования и промывания в воде объект исследования можно резать на тонкие пластинки, предварительно заморозив его на специальном замораживающем микротоме — приборе, при помощи которого изготавливают гистологические срезы. Для замораживания объекта чаще всего используют жидкий углекислый газ либо электрозамораживающую установку. Однако при таком методе обработки материала получают довольно толстые гистологические срезы. Для изготовления более тонких срезов, толщиной до 2 мкм, объект исследования необходимо пропитать веществом, которое сделало бы его более плотным. Такими веществами являются парафин, желатин и целлоидин. Объект после фиксирования и промывания погружают последовательно в спирты возрастающей концентрации — от 50 до 100 градусов — для его обезвоживания и пропитывают желатиной, парафином или целлоидином. После пропитывания и уплотнения объекта его можно резать на микротоме.

Гистологические срезы затем окрашивают специально подобранными красителями, большинство из которых избирательно окрашивает структурные компоненты клеток и тканей. Все красители можно разделить на три группы:

- щелочные, или ядерные, — ими окрашивают ядра клеток и некоторые другие структуры, имеющие кислую реакцию, например эндоплазматическую сеть. Примером щелочных красителей могут быть гематоксилин, кармин, сафранин;

- кислые, или цитоплазматические, которыми окрашивают цитоплазму клеток. Наиболее распространенными кислыми кра-

сителями являются эозин, пикриновая кислота, кислый фуксин, индигокармин;

- специального назначения — избирательно окрашивают структурные компоненты клеток либо вещества определенной химической природы. Наиболее распространенными красителями специального назначения являются судан III, осмиеловая кислота, окрашивающая жиры и жироподобные вещества; орсеин, окрашивающий эластин.

После окрашивания гистологические срезы быстро обезвоживают в спиртах, просветляют в ксилоле или толуоле, переносят на предметное стекло, заливают тонким слоем канадского бальзама или полистирола и накрывают покровным стеклом. Бальзам, полистирол и стекло имеют одинаковый показатель преломления света, и лучи света минимально рассеиваются, проходя через препарат.

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.

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.

Метод культуры тканей. Имеет большое значение при изучении процессов эмбрионального гистогенеза, регенерации и трансплантации тканей. Широко применяется в гистологии и эмбриологии. Суть данного метода в том, что отдельные клетки определенных тканей выделяют в стерильных условиях и культивируют

в питательной среде, которая состоит из многих компонентов, необходимых для жизнедеятельности клеток. Клетки теплокровных животных культивируют в термостате при температуре тела, а холоднокровных — при комнатной температуре. Время от времени клетки пересевают на свежую питательную среду и используют на протяжении многих лет для экспериментов.

Метод микрохирургии. Используется для проведения экспериментов на клетках, тканях и зародышах в гистологии и эмбриологии. При помощи таких микроопераций можно, например, выделить из ткани отдельную клетку, удалить из клетки ядро, перенести ядро из одной клетки в другую или переместить часть клеток зародыша, разъединить бластомеры дробящегося яйца. Все эти эксперименты осуществляются при помощи прибора, который называется микроманипулятором. В состав этого прибора входят микроскоп, система рычагов с различной степенью плавного регулирования. К рычагам присоединяются миниатюрные инструменты: стеклянные капилляры, иглы, крючки.

Метод автордиографии. Обнаруживаются вещества, меченные радиоактивными изотопами. Этот метод получил название гистохимического, или цитохимического, метода исследования.

Метод электронно-микроскопического исследования. Изучение препаратов при помощи электронного микроскопа. В электронном микроскопе вместо пучка света используется пучок электронов, движущийся в вакууме, вместо оптических частей — магнитные поля, вместо глаза электроны попадают на люминесцирующий экран или на фотопластинку. Прямое увеличение электронных микроскопов достигает 600 тыс. раз.

Умерщвление экспериментальных животных

В лабораторной практике применяют ряд методов умерщвления экспериментальных животных: отсечение головы (декапитация), умерщвление при помощи наркоза, пропускание электрического тока через тело животного, введение в кровеносное русло воздуха (укол в сердце или внутривенно) или в плевральную полость эфира (хлороформа).

Выбор метода диктуется видом животного и целями исследования, но наибольшее распространение в лабораторной практике получили два первых способа умерщвления.

Отсечение головы (декапитация) является основным способом умерщвления мелких лабораторных животных (лягушки, мыши, крысы) и осуществляется с помощью ножниц.

Взятие материала

Главным требованием при взятии материала являются: максимальное сокращение сроков взятия, минимальное травмирование тканей, создание оптимальных условий для фиксации.

Первое и второе требование обеспечивается хорошим освоением техники умерщвления и вскрытия, а также применением очень острых режущих инструментов (скальпель, бритва, ножницы).

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

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. Поперечные же и продольные размеры не имеют столь важного значения и определяются задачами исследования.

Вырезание кусочков для фиксации является одним из ответственных этапов в приготовлении качественных микропрепаратов и исследовательской практике и, как правило, должно производиться самим исследователем.

Если орган состоит из участков, различных по своему строению, необходимо проводить разрез таким образом, чтобы все они попали в кусочек, а при невозможности — брать кусочки отдельно из каждого участка. Например, при взятии кусочков мозга человека или крупных лабораторных животных приходится вырезать участки из определенных отделов. Из почки можно вырезать один кусочек, охватывающий всю толщину ор-

гана от капсулы до лоханки, что обеспечивает попадание в него всех слоев. Если орган имеет однородное строение (большинство желез, мышцы), то выбор места для вырезания кусочка не имеет большого значения.

Если необходимо приготовить гистологические препараты 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 вверх.

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 погружения необходимо кусочек органа завернуть в марлю вместе с каким-либо грузом.

Материалом для гистологического исследования могут служить кусочки органов экспериментальных животных, полученные путем прижизненного иссечения у человека кусочки тканей (биопсия), трупный материал, мазки жидких исследуемых материалов (крови, костного мозга).

После умерщвления тело животного быстро фиксируют в положении на спине. Лягушек, тритонов, мышей и других мелких лабораторных животных фиксируют на дощечках, восковых или пробковых пластинках, прикалывая за растянутые в стороны лапки. Для фиксации средних и крупных лабораторных животных используют специальные станки или же изготовленные для этих целей доски (оцинкованные или окрашенные с вбитыми по краям крючками или гвоздиками для привязывания конечностей).

Техника вскрытия брюшной и грудной полостей для всех лабораторных животных одинакова. Однако у животных, имеющих шерстный покров, вначале следует иссечь достаточно широкий кожный лоскут, чтобы избежать загрязнения внутренних органов. Для этого, захватив и приподняв (с помощью хирургического пинцета) кожу нижней части стенки живота по средней линии, подрезают ножницами образовавшуюся складку по направлению к голове, срезая кожный лоскут на нужном протяжении.

Затем следует сменить ножницы (или очистить их от прилипшей шерсти) и удалить влажным тампоном шерсть, попавшую на образовавшуюся «дорожку».

Вскрытие брюшной полости проводят следующим образом: нижнюю часть стенки живота приподнимают пинцетом по средней линии (чтобы не повредить органы), прорезают ножницами вход в брюшную полость, вводя туда одну из браншей (но обязательно тупую) и разрезают стенку кверху до грудины. Затем берут кровоостанавливающие зажимы, захватывают ими внутренние слои стенки живота вместе с брюшиной и отворачивают кнаружи, раскрывая брюшную полость.

Вскрытие грудной полости производится двумя разрезами через реберные хрящи по обе стороны от грудины снизу вверх. Образовавшийся костно-хрящевой лоскут удаляют.

У мелких лабораторных животных следует вскрыть одновременно брюшную и грудную полости для обеспечения достаточно свободного доступа к внутренним органам, у крупных же вскрывать только ту полость, откуда необходимо брать органы для исследования.

Фиксация материала

Задачи и правила фиксации

Цель фиксации — убить клетку, прекратить происходящие в ней процессы (прежде всего ферментативные) и, по возможности, сохранить ее прижизненное строение.

Существует ряд общих правил фиксации: 1) объем фиксирующей жидкости должен не менее чем в 20 раз превышать объем фиксируемого кусочка ткани; 2) фиксатор должен иметь доступ к фиксируемому материалу со всех сторон, поэтому на дно сосуда кладут вату или кусочек фильтровальной бумаги или подвешивают кусочек на нитке; 3) продолжительность фиксации зависит от свойств фиксатора, прежде всего от скорости проникновения фиксатора в ткань; 4) различные фиксаторы сохраняют различные структурные и химические компоненты клетки.

Виды фиксаторов

Большинство фиксаторов оказывает уплотняющее действие на обрабатываемый материал. Размер исследуемых кусочков должен быть таким, чтобы произошло полное его пропитывание в оптимальные для данного фиксатора сроки. В среднем для большинства фиксаторов берут кусочки толщиной в 5–10 мм.

Различают фиксирующие средства (простые фиксаторы) и фиксирующие смеси (сложные фиксаторы).

1. Формалин является самым дешевым и распространенным фиксатором.

В чистом виде представляет, светлую, сильно пахнущую жидкость, состоящую из 40 % водного раствора формальдегида. Применяют преимущественно в виде 10 %-го водного раствора, для чего часть формалина (т. е. 40 % раствора формальдегида) разводят 9 частями воды. Приготавливают раствор обязательно на водопроводной воде, т. к. дистиллированная вызывает набухание тканей.

Широкое применение формалин получил благодаря ряду свойств:

- высокой степени диффузии;
- способности хорошо сохранять форму, окраску и структуру исследуемого объекта;
- оказывать длительное фиксирующее действие (до нескольких лет), существенно не ухудшая при этом качество материала;
- хорошо сохранять жиры и липоиды.

Высокая диффузионная способность и незначительное осаждающее действие обеспечивают довольно быстрое и глубокое проникновение формалина в ткани, что позволяет фиксировать кусочки органа размером от 1 см и более, а при необходимости и довольно крупные органы целиком.

Срок фиксации тканей в формалине 24–48 ч. Обычный формалин, как правило, содержит примесь метилового спирта и муравьиной кислоты, количество которой увеличивается под влиянием света.

При охлаждении формалина в растворе появляется муть, оседающая в виде белого осадка (параформальдегид). Такой же оса-

док наблюдается на стенках сосуда и при испарении формалина. Поэтому формалин следует хранить в темной, плотно закрывающейся стеклянной посуде при температуре не ниже 9 °С.

Нейтрализация формалина. Примесь в формалине муравьиной кислоты придает раствору слабокислый характер, что нежелательно при применении ряда методов исследования (некоторые гистохимические реакции, серебрение раствором нитрата серебра). Способ нейтрализации формалина довольно прост: в сосуд засыпают карбонат кальция (или карбонат магния) в таком количестве, чтобы на дне образовался слой толщиной в 1,5–2 см. Затем наливают формалин, несколько раз энергично встряхивают и оставляют стоять 24–48 ч. В течение этого времени происходит нейтрализация раствора.

Побочные действия формалина. Длительное хранение препаратов в концентрированном растворе формалина придает тканям чрезмерную плотность, затрудняющую дальнейшую обработку и ухудшающую качество препарата. Устранить этот недостаток можно путем помещения материала на 2 недели в 1 %-й раствор нитрата серебра или 10 %-й раствор лимонной кислоты. Длительное хранение в 10 %-м растворе формалина приводит также к набуханию объекта, что необходимо помнить при его измерении после фиксации. При фиксации формалином в препаратах нередко появляется темно-коричневый кристаллический осадок — результат взаимодействия формалина с находящимся в тканях гемоглобином. Его удаляют путем помещения неокрашенных срезов в 1–5 %-й раствор аммиака или 70 %-й этиловый алкоголь на различные сроки (от 5 мин до 4 ч). Затем препарат тщательно промывают и ведут дальнейшую обработку.

Следует постоянно помнить, что длительное действие паров формалина сильно раздражает слизистые оболочки. Смачивание кожи формалином оказывает дубящий эффект, а при повторных частых контактах вызывает сухую экзему. Поэтому перед препарированием формалиновые препараты помещают в слабо аммиачную воду (для устранения запаха) и работают в резиновых перчатках (при возможности под вытяжным устройством).

2. *Этиловый спирт*. Фиксирующее действие осуществляется за счет отнятия у тканей воды и коагуляции белков. Несмотря на ряд отрицательных свойств спирта (сморщивание клеток в результате быстрого отнятия воды, растворение и экстракция жиров и гемоглобина), он как фиксатор находит широкое применение в микроскопической технике. Это объясняется тем, что этиловый спирт осуществляет быструю фиксацию, не требующую обезвоживания тканей перед заливкой в парафин и целлоидин. Будучи химически неактивным веществом, спирт особенно пригоден при гистохимических исследованиях. В нем хорошо сохраняются такие вещества, как муцины, гликоген, мочевиная кислота, железо, кальций, которые легко растворимы в других фиксирующих жидкостях.

Чаще применяют 96 %-й и абсолютный этиловый спирт. Некоторые авторы рекомендуют также концентрации 80 и 90 %. Время фиксации зависит от материала: для тонких пленок — 15–30 мин, для кусочков толщиной 3–4 мм — 2–4 ч. В связи с тем что спирт легче воды, она, экстрагируясь из тканей, опускается на дно. Поэтому под кусочки исследуемого материала нужно обязательно подкладывать толстый слой ваты. Излишнее пребывание препарата в спирте вызывает чрезмерное уплотнение ткани, что плохо отражается на последующей ее обработке.

Для приготовления абсолютного спирта 96 %-й спирт наливают на прокаленный сульфат меди, лишенный кристаллизационной воды и имеющий вид серовато-белого порошка. Отнимая воду от спирта, он приобретает синий цвет. Обезвоживание лучше проводить последовательно в двух или трех сосудах. При этом в последнем сосуде медь остается почти безводной и абсолютный спирт над ней может храниться долго.

Время фиксации в этиловом спирте — 12–24 ч, при этом фиксатор нужно 3 раза сменить. Преимущества метода: быстрота, пригодность почти для всех методов окрашивания, хорошая сохранность водорастворимых элементов (гликоген, мочевиная кислота).

3. *Ацетон*. В последнее время все большее применение в гистологических лабораториях находит фиксация ацетоном благодаря простоте, возможности быстрой фиксации и сохранению

после нее многих химических соединений, в том числе активности многих ферментов. Недостаток метода — нарушение тонкой цитологической структуры. Применять следует бесцветный (безводный) раствор. Фиксировать можно как кусочки тканей, так и срезы. Приготовленные в криостате срезы расправляют кисточкой на предметном стекле, переносят в плотно закрытый стаканчик с холодным (5–10 %) уксусом и помещают в баню с сухим льдом или же в камеру криостата. Срок фиксации зависит от толщины срезов (в среднем 5–10 мин, можно хранить и несколько дней).

СЛОЖНЫЕ ФИКСАТОРЫ

Жидкость Мюллера. В настоящее время применение ее в чистом виде ограничено. Однако она служит исходным раствором для приготовления таких распространенных фиксаторов, как жидкости Ценкера, Орта, Максимова и др.

Состав:

Бихромат калия — 2,5 г

Сульфат натрия — 1,0 г.

Вода дистиллированная 100 мл.

Для лучшего растворения бихромата калия рекомендуется подогревать воду.

Фиксация по Навашину — Крылову. Фиксация этим методом дает хорошие результаты при окраске ядер и протоплазматических структур железным гематоксилином.

Состав фиксатора Навашина:

Хромовой кислоты 1 %-й р-р — 10 мл

Формалин, 10 %-й р-р — 10 мл

Вода дистиллированная — 90 мл.

Уксусная кислота ледяная — 2 мл (добавляют непосредственно перед фиксацией).

Кусочки толщиной в 5 мм следует фиксировать 4–6 ч; затем тщательно промыть в проточной воде (24–36 ч) для удаления хромовой кислоты, остатки которой ухудшают окраску препаратов. Г. И. Крылов предложил перед промывкой проводить кусочки через несколько порций 5–10 %-го формалина до прекращения желтого окрашивания раствора (формалин извлекает хромовую кислоту из тканей). Эта процедура сокращает сроки промывания в воде.

Фиксатор ФСУ

(формалин, спирт, уксусная кислота) Бродского.

Рекомендуется для изучения структуры тканей и количественного цитохимического анализа нуклеиновых кислот. Преимущество ФСУ перед фиксатором Карнуа в том, что формалин подавляет активность ферментов, разрушающих нуклеиновые кислоты (нуклеазы) в фиксируемых клетках, благодаря чему количественно лучше сохраняются ДНК и РНК.

Состав и способ употребления:

Формалин нейтральный разведенный — 3 части

Спирт этиловый 96° — 1 часть

Уксусная кислота ледяная — 0,3 части

Кусочки тканей 2 x 2 или 2 x 3 мм; время обработки 1–4 ч в зависимости от свойств объекта.

После фиксации кусочки промыть водой в течение 12 ч или (для цитохимических целей) в течение того же времени тремя сменами 70 %-го спирта. Быстро обезводить и залить в парафин.

Фиксатор Шабадаша. Рекомендуется как лучший фиксатор для гистохимического выявления гликогена (особенно где его мало — в центральной нервной системе).

Состав:

Первый раствор — спирт этиловый 96 % — 100 мл, нитрат меди — 1,8 г, нитрат кальция — 0,9г, формалин нейтральный — 10 мл.

Второй раствор — спирт этиловый 96 % — 100 мл, нитрат кадмия — 2,6 г, формалин нейтральный — 10 мл.

Кусочки органа (не более 3 x 3 мм) фиксировать 3 ч в первом растворе, затем перенести во второй раствор на 3 ч. Промыть в трех-четырех сменах 70 %-го спирта по 2 ч. Залить в парафин или целлоидин.

Промывание

Цель этой процедуры — освободить исследуемый объект от излишнего количества фиксатора. Способ промывания зависит от методики фиксации. Например, после фиксирующих смесей, содержащих пикриновую кислоту, дихлорид ртути, трихлоруксусную кислоту, применяют этиловый спирт разной концентрации.

После фиксации в формалине, в жидкостях, содержащих хром, осмиевую кислоту, обычно употребляют воду. В большинстве случаев промывку кусочков тканей производят в проточной водопроводной воде. Наиболее удобно это делать, помещая объект в стеклянные или фарфоровые сита, которые закрывают пробкой и опускают в сосуд с проточной водой. Пробка обеспечивает плавучесть, а отверстия — постоянную циркуляцию воды. Если кусочек не прошит ниткой, то этикетку также помещают в сито. При отсутствии сита кусочек заворачивают в марлю и подвешивают за нитку в сосуд, наполненный водой. Верх сосуда закрывают марлей и проделывают в ней небольшое отверстие. На водопроводный кран натягивают резиновый шланг или привязывают шнур (полоску бинта), свободный конец которого пропускают через марлю в сосуд и пускают по нему несильную струю воды. Среднее время промывания — 20–24 ч.

Обезвоживание

Начиная с этого этапа и до самого конечного момента приготовления гистологического препарата следует строго придерживаться правила постепенного воздействия применяемых веществ на исследуемые ткани. После промывания кусочки подвергают дальнейшему уплотнению путем обезвоживания в спиртах увеличивающейся концентрации. Для проведения процедуры приготавливают необходимое количество бюксов или стаканчиков с притертыми крышками (можно использовать небольшие банки с завинчивающейся крышкой), этикеткируют их и заливают спиртами: 50, 60, 70, 80 и 96 % (по два стаканчика), 100 % (два стаканчика). Такой последовательный ряд сосудов получил название гистологической батареи.

Спирты нужной крепости приготавливают заранее по специальной таблице разведения из 96 или 95 %-го этилового спирта.

Способ приготовления абсолютного этилового спирта. Обычный спирт-ректификат содержит 96 % чистого спирта и 4 % воды. Для того чтобы получить абсолютный спирт, необходимо извлечь воду. Наиболее распространенным способом является обезвоживание при помощи прокаленного медного купороса (сульфат меди).

**Приготовление различных концентраций спиртов
для гистологических исследований**

Для получения 100 мл спирта	Необходимое количество компонентов, мл					
	96° спирта	воды	90° спирта	воды	80° спирта	воды
50°	52	48	44	56	50	50
60°	63	37	50	50	56	44
70°	73	27	56	44	63	37
75°	78	22	83	17	94	6
80°	83	17	89	11	–	–
90°	94	6	–	–	–	–

В основе этого метода лежит свойство сульфата меди отдавать и присоединять молекулы воды, меняя при этом свой цвет (прокаленный сульфат меди имеет вид серовато-белого порошка; который по мере присоединения воды приобретает синюю окраску). Насыпав порошок прокаленного медного купороса (примерно 10 г на 100 мл спирта) в чистую стеклянную бутылку с притертой пробкой, наливают туда же 96 %-й спирт. Затем бутылку встряхивают до равномерного распределения порошка. Подобную процедуру повторяют на протяжении 1–2 дней. По мере поглощения воды порошок приобретает синюю окраску. Однократная обработка, как правило, не дает обезвоживания, поэтому спирт переливают в другой сосуд, содержащий свежую порцию сульфата меди. Подобную процедуру повторяют до тех пор, пока осадок не перестанет приобретать голубой цвет. Обезвоженный спирт отфильтровывают в чистую посуду, которую плотно закрывают. Желательно проверить pH абсолютного спирта, т. к. после обработки сульфатом меди он может стать слегка подкисленным. Для нейтрализации достаточно прибавить небольшое количество карбоната кальция (CaCO₃).

Если в лаборатории нет фабричного порошка безводного сульфата меди, то его можно приготовить самим, прокалив кристаллическую соль над огнем в широкой фарфоровой чашке (до тех пор, пока из синих кристаллов не образуется белый порошок). Для равномерного прокаливания необходимо перемешивать купорос стеклянной палочкой. Нельзя допускать почернения (особенно заметного по краям чашки), свидетельствующего о перекаливании. Таким же путем обрабатывают медный купорос, оставшийся после обезвоживания спирта.

Следует помнить, что порошок медного купороса сильно раздражает слизистые оболочки. Нужно проводить прокаливание в вытяжном шкафу или же защищать слизистые оболочки носа и рта обычной марлевой маской.

Испытание абсолютного спирта на содержание воды производят опусканием в него нескольких зерен карбида кальция. Появление характерного запаха ацетилена и помутнение свидетельствуют о наличии воды. Более грубый способ — прибавление нескольких капель абсолютного спирта к 4–5 мл бензола или ксилола. Помутнение жидкости указывает на то, что спирт содержит около 3 % воды.

Если препарат промывали в воде, то обезвоживание начинают с 50 %-го спирта, если же в спиртах (после жидкости Ценкера и др.), то объект помещают в спирт последующей крепости (из 70 % в 80 % и т. д.). При тонких цитологических исследованиях обезвоживание начинают с 10–20 %-го спирта. Время пребывания кусочков в отдельных спиртах определяется их величиной и свойствами. Объекты средней величины (толщиной 5 мм) достаточно держать в слабых спиртах (до 60 %) по 2–4 ч, а в более крепких — от 12 до 24 ч. Мелкие и более тонкие объекты можно проводить соответственно быстрее. Для того чтобы спирт проникал в ткани равномерно со всех сторон, объект помещают на слой ваты (обычной или стеклянной) или подвешивают в стеклянном сите. При таком расположении кусочков спирт, отнимающий воду из тканей и стекающий ко дну, не мешает дальнейшему обезвоживанию.

Следует помнить, что длительное пребывание объекта в спиртах низкой концентрации приводит к мацерации тканей, в то вре-

мя как передержка в спиртах высокой концентрации чрезмерно уплотняет их. Поэтому если необходимо прервать процесс обезвоживания, то материал можно оставить на несколько дней в «индифферентном» спирте, крепость которого составляет 70–80 %.

Необходимо также учитывать, что спирты в процессе обезвоживания довольно быстро загрязняются экстрагируемыми из тканей веществами, особенно жирами. Не следует использовать длительное время одни и те же спирты. Необходимо своевременно их менять.

В процессе обезвоживания могут быть допущены ошибки:

- 1) переуплотнение при полном обезвоживании;
- 2) нормальное уплотнение при недостаточном обезвоживании.

Оба эти недостатка являются следствием несоблюдения оптимальных условий обезвоживания и отрицательно сказываются на дальнейшей обработке материала. Достижение хороших результатов дается только опытом, поэтому необходимо тщательно регистрировать все этапы и внимательно анализировать результаты (особенно при освоении методов).

Перед тем как перенести объект в 96 %-й или абсолютный спирт, следует придать кусочку окончательную форму и размеры (обрезать поврежденные или излишние участки). Для полного обезвоживания следует проводить материал последовательно через две порции абсолютного спирта (по 12–24 ч).

Обезвоживание в изопропаноле (2-ПРОПАНОЛ)

Обезвоживание тканей возможно с помощью 99 %-го изопропилового спирта, который непосредственно смешивается с парафином без промежуточных растворителей.

Изопропиловый спирт и его применение в гистологической технике. Изопропиловый спирт (изопропанол) может служить заменителем этилового спирта (этанол) во многих областях его применения. Как правило, в лабораториях объемы этанола жестко нормированы, а при большом потоке материала требуется большое количество спирта для обеспечения хорошего обезвоживания и дальнейшей пропитки парафином. Изопропиловый спирт ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) обладает всеми свойствами вторичных спиртов жирного ряда, хорошо смешивается с водой и органически-

ми растворителями во всех соотношениях. Температура кипения изопропилового спирта (82,4 °С) близка к температурам кипения этилового спирта: абсолютный спирт (78,4°С) и 96° (78,15 °С). Устойчивость смесей изопропилового спирта с различными растворителями парафина к действию воды почти та же, что и у соответствующих смесей с этиловым спиртом (см. табл.); смеси с метиловым спиртом менее устойчивы, смеси же с ацетоном и диоксаном расслаиваются при добавлении совсем незначительных количеств воды.

Ткани можно переносить в парафин непосредственно из изопропилового спирта или из подогретой (50 °С) смеси парафина с изопропиловым спиртом (см. ниже). Следовательно, при использовании проводки на основе изопропанола прекращается использование ксилола, хлороформа и других промежуточных сред, что значительно упрощает и удешевляет процесс. Во избежание появления артефактов после такой проводки (слабое расслоение коллагеновой ткани и небольшие изменения жировой ткани) по сравнению с классической проводкой через этиловые спирты с использованием промежуточных сред в изопропиловый спирт рекомендуют добавлять небольшое количество неионогенных поверхностно активных веществ (например, Тритон X15 (октилфеноксиполиэтоксиэтанол)).

Изопропиловый спирт наилучшим образом заменяет абсолютный этиловый спирт при обезвоживании окрашенных препаратов перед просветлением. Фабричный абсолютный спирт отечественного производства очень сложно приобрести, т. к. он пользуется относительно малым спросом и его выпускает ограниченное количество заводов, кроме того, он может содержать высокотоксичное вещество — бензол (II класс токсичности). Абсолютный этанол зарубежного производства на порядок дороже изопропилового спирта и продается фирмами, обладающими лицензией на продажу этиловых спиртов (по причине особого государственного регулирования этанола).

Таблица 2

**Количество воды,
вызывающее помутнение смеси равных частей
обезвоживающего и просветляющего агентов (%)**

<i>Обезвоживающее вещество</i>	<i>Бензол</i>	<i>Ксилол</i>	<i>Хлороформ</i>	<i>Четырех хлористый углерод</i>	<i>Петролейный эфир</i>	<i>Бензин (октановое число 100)</i>	<i>Метил-саллицилат</i>
Метиловый спирт (абсолютный)	6,5–7	3–3,5	17,5–18	4,5–5	1	не смешиваются	6,25
Этиловый спирт (абсолютный)	12–14	7,8	13–14	10–11	4,5	3,5–4	13,25
Изопропанол (99 %)	9,5–10	10	7–7,5	7,5–8	11–11,5	8,5–9	17
Ацетон, технический	1,75–3	1,5–2	2–2,2	1,5–1,6	0,5–1	1,5–1,6	4,75
1,4-Диоксан, чистый	1,5–2	1–1,5	1,5–2	1–1,5	1,5	1–1,5	3,75

Можно предложить следующую схему обезвоживания препаратов после окрашивания:

1. 100° этиловый спирт.
2. Изопропиловый спирт.
3. Смесь 1:1 изопропилового спирта и ксилола.
4. Ксилол или заменитель I.
5. Ксилол или заменитель II.
6. Заключение в полистерол или другую синтетическую среду.

Таким образом, изопропиловый спирт 99 % является наилучшим заменителем этилового спирта в гистологической технике.

Пропитывание и заливка

Приготовление высококачественных гистологических препаратов требует наличия равномерно тонких срезов с исследуемого объекта. Для того чтобы их получить, кусочки тканей надо пропитать и залить такой средой, которая превратила бы их в хорошо режущуюся массу.

Следует помнить, что процесс пропитывания и заливки исследуемого материала требует большой тщательности. Незнание основных принципов и несоблюдение необходимых условий может привести к тому, что объект окажется непригодным для резки или полученные срезы будут некачественными.

Наиболее употребительным для этих целей материалом является парафин.

Заливка в парафин

Этот метод широко распространен в исследовательских гистологических лабораториях благодаря относительной скорости заливки (в течение 1–2 дней после обезживания), возможности приготовления серийных срезов, а также тонких срезов для цитологических исследований (толщина 2–3 мкм), удобству хранения блоков и неокрашенных срезов (практически неограниченное время). К недостаткам метода следует отнести значительное сжатие исследуемого материала (до 20 %), вызываемое воздействием высокой температуры в процессе пропитывания парафином. Богатые водой, рыхлые ткани малопригодны к заливке в парафин. Известное неудобство представляет необходимость удаления парафина из срезов перед их окраской.

Парафин при комнатной температуре — твердое гомогенное вещество. Существует несколько сортов парафина: мягкие (точка плавления 45–54 °С) и твердые (точка плавления 58–60 °С).

В большинстве случаев для заливки применяют парафин с точкой плавления 54–56 °С. Если резка предполагается при низкой температуре окружающей среды, то лучше применять парафин с более низкой точкой плавления (48–50 °С). Нужная степень твердости парафина достигается смешиванием в различных комбинациях мягких и твердых сортов.

Заливка в парафин требует тщательного соблюдения двух основных условий:

- 1) препарат должен быть полностью обезвожен,
- 2) не должен содержать спирт.

Первое условие, как мы уже знаем, обеспечивается в процессе обезвоживания и уплотнения в батарее спиртов повышающейся концентрации.

Для удаления спирта и подготовки к пропитыванию парафином материал обрабатывают одним из растворителей парафина, обладающим способностью вытеснять спирт. К таким веществам относятся хлороформ, бензол, толуол, ксилол, сероуглерод, петролейный эфир, четыреххлористый углерод (CCl_4). Чаще используют хлороформ и бензол. Толуол и ксилол делают кусочки более твердыми.

Парафин ГОСТ 23683-89

Парафин — смесь высокомолекулярных углеводородов C_{18} — C_{35} , преимущественно алифатического нормального строения, получаемая при перегонке нефти.

Парафин нефтяной твердый ГОСТ 23683-89 распространяется на очищенные твердые нефтяные парафины кристаллического строения, получаемые из дистиллятного сырья и предназначенные для применения в различных отраслях промышленности.

Парафин не растворяется в воде, но растворяется в большинстве органических растворителей: бензине, эфире, жирных и эфирных маслах. Состав и свойства парафинов зависят от природы нефти и от способа получения этих продуктов. Температура плавления — $45-52$ °С, температура кипения — 350 °С. Отсутствие циклических углеводородов в парафинах создает повышенное напряжение в них и делает систему хрупкой, что приводит к возрастанию прочности.

Парафин марки П-2 — высокоочищенный парафин, применяется для покрытия и пропитки гибкой упаковки пищевых продуктов, сохраняющей эластичность при пониженных температурах, а также в качестве компонентов сплавов для покрытия деревянных, бетонных, металлических емкостей, предназначенных для хранения пищевых продуктов; в производстве различ-

ных восковых составов; как компонент пластичных смазок, для получения синтетических жирных кислот; изделий медицинской техники и косметических препаратов.

Парафин нефтяной твердый высокоочищенный марки П-1, П-2 герметично упакован в целлофановые пакеты. Минимальная фасовка составляет около 23 кг.

Гарантийный срок хранения парафинов марки П — один год со дня изготовления.

Если точка плавления парафина неизвестна, ее можно определить. Для этого расплавленный парафин насасывают в тонкий стеклянный капилляр и дают ему застыть. Затем очищают капилляр снаружи от приставшего парафина и вместе с градусником опускают в химический стаканчик с водой, которую начинают постепенно нагревать, перемешивая стеклянной палочкой. Как только парафин в капилляре начнет расплавляться, отмечают температуру, которая и укажет точку его плавления.

Следует помнить, что обычный продажный парафин часто содержит газообразные примеси, которые при заливке образуют пузырьки, придающие парафину повышенную ломкость и значительно ухудшающие качество резки материала. Для избавления от этих примесей свежий парафин следует на длительное время оставить в расплавленном виде в плоских чашках (чтобы увеличить площадь для выделения газов) при температуре 70 °С (для этого можно приспособить сушильный шкаф). Можно также подвергать парафин частому расплавлению и нагреванию (до появления дыма) с последующим быстрым охлаждением.

Если парафин, несмотря на соответствующую подготовку, сохраняет жесткость, к нему следует добавить чистый пчелиный воск в количестве 2–5 %, что придаст парафину большую эластичность.

Воск пчелиный ГОСТ 21179-2000

Воски природные — жироподобные вещества животного или растительного происхождения. Воск природный состоит из сложных эфиров жирных кислот и одно- или двухатомных высших спиртов; содержит также свободные высшие спирты, углеводороды и жирные кислоты. Делятся воски на животные (пчелиный

воск и др.), растительные, минеральные, воски микроорганизмов. Аморфные вещества плавятся в интервале 40–90 °С; термопластичны. Воски природные (натуральные) не растворяются в воде. Растворяются же они в большинстве органических растворителей, эфире, бензине и т. д. По составу воск представляет собой смесь церотиновой кислоты, пальмитинового эфира и др.

Область применения: для приготовления косметических средств, полировочных мастик, водоотталкивающих пропиток для тканей, красок; при выделке кожи, в медицине. Воск идёт для приготовления свечей, искусственных цветов; для лепки вместо глины.

Вместо парафина рекомендуют использовать готовый коммерческий продукт ПАРАПЛАСТ или отечественный аналог ГИСТОМИКС.

Histomix® (Гистомикс), в отличие от обычного парафина, является готовой средой для заливки и не требует добавления воска или какой-либо дополнительной обработки. Гранулированная форма удобна для дозирования. Histomix® (Гистомикс) при изготовлении проходит многоступенчатую очистку в антипылевых условиях, поэтому его не нужно фильтровать.

Состав включает в себя компоненты, которые значительно улучшают пропитывание тканей, обеспечивает получение качественных срезов до 4 мкм, в том числе в сериях. Срезы легко расправляются и хорошо прилипают к стеклу.

Методика пропитывания

Обезвоженные и уплотненные кусочки перекалывают из абсолютного спирта в чистый ксилол, где они вначале плавают (выступая над его поверхностью), а затем, по мере пропитывания, постепенно погружаются.

В процессе удаления спирта ксилол меняют 2–3 раза на протяжении 1–3 ч (в зависимости от свойств объекта и толщины кусочков). При величине кусочка 1 x 1 см его держат в ксилоле 30 мин. Затем, соблюдая принцип постепенного замещения ксилола парафином, помещают объект в смесь из равных частей парафина (желательно мягкого) и ксилола. Эта смесь, застывающая при комнатной температуре, при нагревании до 37 °С расплав-

ляется и приобретает жидкую консистенцию. Кусочки находятся в ксилоле-парафине при 37 °С в течение 3–6 ч (при 56 °С время сокращают до 30 мин — 1 ч). При необходимости отсрочить дальнейшую обработку материала можно после погружения объекта в смесь ксилола с парафином извлечь сосуд из термостата и оставить при комнатной температуре на ночь (или даже на несколько дней) в закрытом состоянии, а затем, вновь расплавив в термостате при 56 °С, перенести в рядом стоящий горячий парафин для пропитывания. Излишнее пребывание объекта в растопленном ксилоле-парафине ухудшает качество резания.

Для полного освобождения объекта от ксилола кусочки проводят последовательно через две-три порции расплавленного парафина. Время пребывания в парафине зависит от величины кусочков и свойств ткани. Кусочки толщиной 2–5 мм должны в общей сложности находиться в парафине 2–5 ч.

Если объект хорошо обезвожен и не содержит спирта, задержка в парафине не ухудшает качества объекта даже при пропитывании в течение нескольких дней. При наличии же в кусочках остатков воды и спирта результаты обработки ухудшаются прямо пропорционально длительности излишнего пребывания объекта в расплавленном парафине. Парафин для пропитывания можно применять многократно, но при этом нужно строго следить за тем, чтобы не перепутать порции парафина. Для этого бюксы (или стаканчики) необходимо обозначить соответствующими цифрами (1, 2, 3).

После окончательного пропитывания объекта его заливают расплавленным парафином, специально приготовленным для этих целей и хранящимся в термостате.

В качестве формочек для заливки используют разнообразные приспособления. Г-образные гладкие угольники изготавливают из металла (латунь, свинец, сталь). Рекомендуется применять угольники, длинная сторона которых равна 8–10 см, короткая — 3 см, высота — 1,5–2 см.

Угольники кладут на отполированную металлическую или стеклянную пластину и, сдвигая углы, создают формочку нужных размеров.

Бумажные коробочки изготавливают из листка плотной бумаги по схеме, представленной на рисунке.

Применяют также фольгу, только в этих случаях следует сразу после заливки еще в жидкий парафин погрузить часть бумажной этикетки. Удобство бумажных формочек заключается в возможности значительно варьировать их размеры, простоте маркировки (простым карандашом на стенках) и длительном хранении залитого материала. Для заливки мелких объектов можно применять часовые стекла, четырехугольные фарфоровые ванночки из-под акварельной краски и другие приспособления.

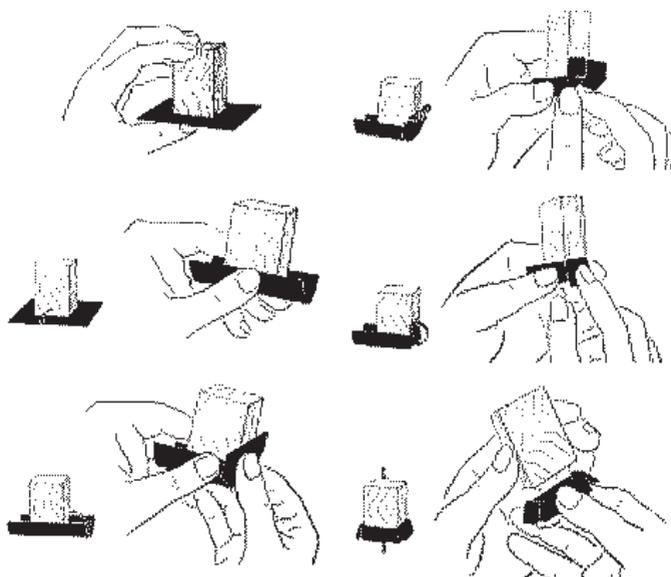


Рис. 1. Изготовление бумажных коробочек

Заливку осуществляют следующим образом. Предназначенный для заливки парафин подогревают до 58–60 °С и аккуратно наливают в приготовленную формочку, заполняя ее до самых краев и избегая образования пузырьков воздуха (хорошо иметь для этих целей высокую фарфоровую кружку с ручкой и носиком). Затем подогревают пинцет или металлический шпатель,

быстро переносят подготовленный к заливке объект в формочку с парафином и ориентируют в необходимом положении.

После этого формочку охлаждают водой (10–18 °С). Если заливку производят с помощью металлических угольников, то пластину помещают в плоскую чашку таким образом, чтобы нижняя ее поверхность не соприкасалась с дном сосуда (на стеклянные или металлические палочки). Затем осторожно наливают воду до верхних краев формы (не заливая поверхность) и дают парафин застыть. При заливке в бумажной коробочке ее постепенно опускают в сосуд с водой и оставляют плавать до полного застывания парафина.

В процессе застывания поверхность блока кратерообразно стягивается, что необходимо учитывать при выборе высоты формы. Если форма недостаточно высокая или залита не полностью и парафин лишь тонким слоем покрывает объект, то при застывании верхняя часть кусочка будет выступать из блока.

Наклейку блоков производят на деревянные кубики. Для этого из затвердевшего парафина скальпелем вырезают четырехугольный блок таким образом, чтобы объект со всех сторон был окружен слоем парафина толщиной 1–3 мм.

Затем, положив на деревянный кубик небольшой кусочек твердого парафина, расплавляют его горячим металлическим шпателем (или скальпелем), проводят этим же шпателем по нижней поверхности парафинового блока и быстро придавливают его к кубику.

Микротомы и работа с ними

Микротом — специальное механическое устройство, предназначенное для приготовления гистологических срезов определенной толщины.

Отечественная промышленность выпускает три типа микротомов:

- 1) санный (МС-2) — для получения парафиновых и целлоидиновых срезов;
- 2) для парафиновых срезов — предназначенный для получения серийных срезов материала, залитого в парафин;

3) замораживающий — микротом, имеющий специальное устройство для замораживания объекта, позволяющее резать нефиксированный, свежий материал.

Саннный микротом (МС-2)

Прибор получил название благодаря тому, что нож и механизм подачи с зажимом для блока (объектодержателем) движутся на специальных салазках.

Основные части микротома: станина, механизм микроподачи, механизм подъема, зажим для блоков (объектодержатель), ножевые салазки с ножедержателем.

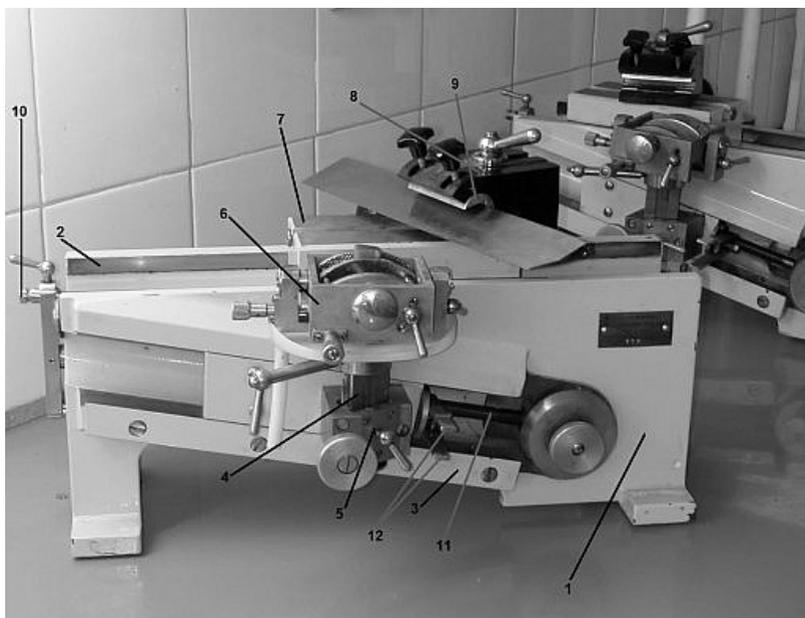


Рис. 2. Устройство санного микротома

Станина — массивная чугунная основа, на которой монтируются все остальные узлы (1). В верхней части имеется паз для перемещения ножевых салазок, несущих ножедержатель (2). На боковой поверхности расположены наклонные направляющие (3) для перемещения салазок с механизмом подъема.

Механизм подъема состоит из трехгранной призмы (4), вставленной в специальную оправу (5), снабженную винтом для подъема призмы и рукояткой для ее закрепления в нужном положении. Оправа, в свою очередь, прочно прикреплена к салазкам, несущим механизм подъема.

Зажим для блоков (рамочный) состоит из внутренней (предназначенной для укрепления блока) и наружной рамок (6). Система рукояток и винтов позволяет изменять положение рамок в продольном и поперечном направлениях. От основания зажима отходит штифт, при помощи которого зажим для блоков вставляются в специальное гнездо, имеющееся в трехгранной призме.

Фиксирование на нужном уровне производят специальной рукояткой.

Ножевые салазки (7) — массивные устойчивые салазки, снабженные ручкой для передвижения и несущие на себе ножедержатель (8), который укрепляют на салазках специальной рукояткой, позволяющей менять горизонтальный угол расположения ножа. Сам же зажим снабжен подвижной цилиндрической втулкой (9), перемещение которой с помощью рычажка меняет угол наклона ножа.

Механизм микроподачи — наиболее сложный узел микротома. Он состоит из стержня (10), соединенного жестко с тягой (несущей на своем конце собачку), храповика и микровинта.

Автоматическая микроподача блока осуществляется следующим образом. При каждом обратном (холостом) ходе ножа ножевые салазки толкают стержень микроподачи и перемещают его. Это вызывает перемещение тяги, которая с помощью собачки поворачивает храповик. Вращение его через конические шестеренки передается микровинту (11), который через разъемную гайку (12) перемещает по наклонным направляющим снизу вверх салазки с зажимом для блока.

Система тяга — стержень — каждый раз с помощью специальных пружин возвращается в исходное положение. Следовательно, чем больше стержень микроподачи выдвинут навстречу ножевым салазкам, тем большим окажется его шаг (а соответственно, и поворот храповика), тем выше переместится блок и тем

толще будет срез. Благодаря тому, что стержень имеет микрометрическую шкалу и специальный зажим, позволяющий менять его положение, можно точно регулировать степень подачи блока.

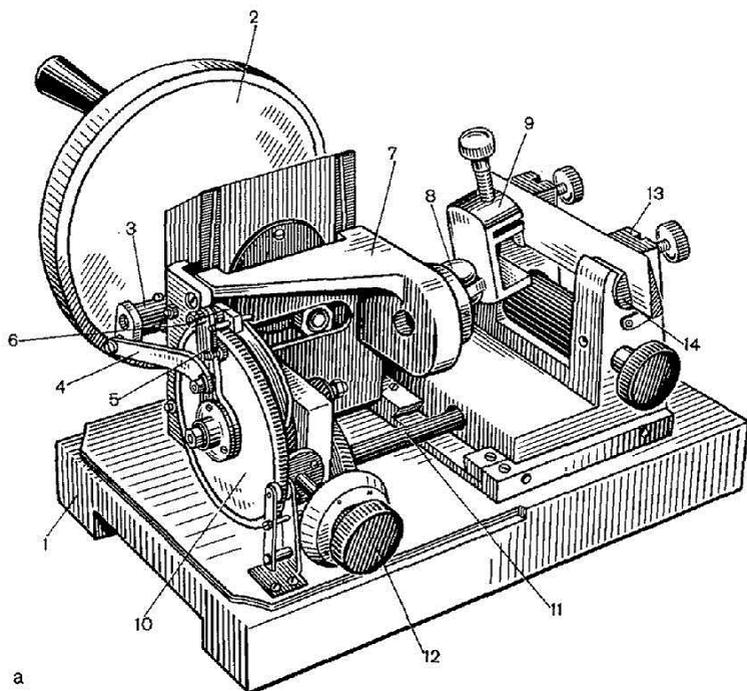
Так как с каждым срезом блок поднимается все выше, то периодически нужно отсоединять микровинт от разъемной гайки и опускать салазки с механизмом подачи в крайнее нижнее положение.

Помимо описанной конструкции микротомов, существуют и другие. Имеются также варианты способа подачи блоков и устройства зажимов для них. Однако, несмотря на существующее разнообразие моделей микротомов, все они имеют общие принципы устройства, знание которых позволит успешно освоить их эксплуатацию.

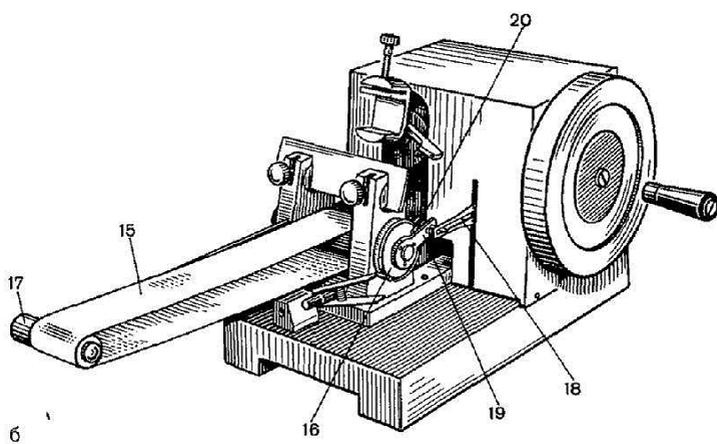
Микротом для парафиновых срезов (МПС-2)

Прибор состоит из основания, приводного механизма, механизма микроподдачи, объектодержателя, ножедержателя с механизмом подачи транспортной ленты, транспортера. Основание (1) — литая чугунная плита, на которой смонтированы все узлы прибора. Приводной механизм состоит из маховика (2), соединенного с кривошипным валом, несущим косозубую шестерню, рычагов, кривошипа, собачки и кареток (для вертикального и горизонтального перемещения объектодержателя). При повороте маховика насаженная на вал косозубая шестерня через парную с ней шестерню передает вращение кривошипу (3), от которого движение передается рычагу (4), качающему рычажок (5) с укрепленной на нем собачкой (6). Благодаря тому, что вал имеет форму кривошипа, он при вращении маховика одновременно сообщает возвратно-поступательное движение (по вертикальным направляющим) каретке подъема (7), имеющей, в свою очередь, горизонтальные направляющие для каретки подачи (8), несущей на себе объектодержатель (9). Совершая движение по вертикали, каретка подъема через водило (18) приводит в действие механизм подачи транспортерной ленты.

Механизм микроподдачи состоит из храповика, дифференциального механизма, микровинта, лимба, косозубой передачи и кулачка.



a



б

Рис. 3. Микротом для производства парафиновых срезов

При повороте вала описанный приводной механизм с помощью собачки (6) поворачивает на определенное число зубьев храповик (10), на оси которого посажено зубчатое колесо (11), передающее через шестерню вращение микровинту. Располагаясь в горизонтальной плоскости, винт перемещает каретку подачи объектодержателя (8).

Установку толщины срезов производят путем поворота лимба (12) (на заданное число делений), вращение оси которого через косозубую передачу передается кулачку, регулирующему величину поворота храповика, т. е. величину подачи каретки с объектодержателем. Объектодержатель (9) — винтовой зажим, вмонтированный в шаровую оправу каретки подачи объектодержателя. Шарнирный механизм позволяет придавать блоку любое нужное положение. Фиксацию объектодержателя производят специальной рукояткой.

Ножедержатель (13) — массивная чугунная подставка, имеющая две вертикальные стойки, снабженные держателями (14), позволяющими придавать ножу нужный угол наклона, отсчитываемый по шкале, расположенной на боковой поверхности стойки (цена деления шкалы 5°). Фиксацию ножа производят винтами.

В переднезаднем направлении ножедержатель перемещается по специальным направляющим и закрепляется рукояткой.

Механизм подачи транспортерной ленты: через стойку ножедержателя пропущена ось, на которую между стойками насажен барабан для транспортерной ленты (15), а снаружи — храповик (16). С помощью кронштейна (17), вставленного в специальное гнездо, транспортерная лента натягивается между барабаном и роликом кронштейна и закрепляется рукояткой. Когда при повороте маховика микротомы происходит движение каретки подъема, храповик автоматически через специальное водило (18), кулачок (19) и собачку (20) поворачивается и передвигает ленту транспортера на заданное расстояние. Для регулировки шага храповика на кулачке нанесена шкала с ценой деления 5 мм.

Изготовление срезов

Предпосылкой для получения хороших гистологических срезов служит правильный выбор угла наклона ножа и угла резания.

Под углом наклона понимают угол, образуемый нижней поверхностью ножа с плоскостью резания. Наилучшим считается такой угол наклона, при котором плоскость заточки ножа расположена параллельно верхней поверхности блока. Обычно он равен 13–15°. Если нож установлен так, что угол наклона больше оптимального, то срез будет крошиться, если меньше — резка невозможна, т. к. лезвие ножа будет лишь скользить по поверхности блока.

Под углом резания подразумевают угол между длинной осью ножа и воображаемой линией, идущей через центр блока параллельно движению салазок, несущих нож. Величина угла резания зависит от свойств обрабатываемого материала: чем он мягче, тем угол меньше, и, наоборот, чем тверже, тем угол больше. При косом расположении ножа уменьшается сопротивление его режущего края поверхности блока, что облегчает резку мягких блоков. Максимальный угол резания равен 90°, минимальный — 20–30°.

Способ приготовления гистологических срезов зависит от вида заливки и свойств самого материала.

Наклеенный на деревянную колодку парафиновый блок прочно закрепляют в зажиме микротомы, расположив длинной осью параллельно длиннику микротомы. Затем, установив необходимый угол резания и правильный угол наклона ножа, его прочно закрепляют винтовыми зажимами и располагают над блоком. После этого, регулируя винтами механизм подачи, блок устанавливают таким образом, чтобы верхняя его плоскость находилась в горизонтальном положении и не доходила до лезвия ножа на 0,5–1 мм. Когда предварительная подгонка блока к ножу закончена, устанавливают микрометрическую шкалу на получение толстых (25–30 мкм) срезов и движением ножевых салазок начинают подавать блок вверх до получения с него первых полных срезов.

Затем производят моделирование блока: срезают скальпелем избыточный парафин, оставляя вокруг залитого объекта слой не более 2–3 мм, и придают блоку прямоугольную форму. После

этого устанавливают микрометрическую шкалу на нужную толщину среза и приступают к окончательной резке материала.

Следует помнить, что перемещение ножевых салазок вдоль рельсового пути нужно производить плавно и без излишних усилий. Нельзя надавливать на рукоятку сверху, т. к. это приводит к вытеснению слоя масла, находящегося между скользящими поверхностями, и опусканию ножа, вследствие чего срезы получаются неравномерными. Движение микрометрическим ножом в момент прохождения над блоком надо производить быстро.

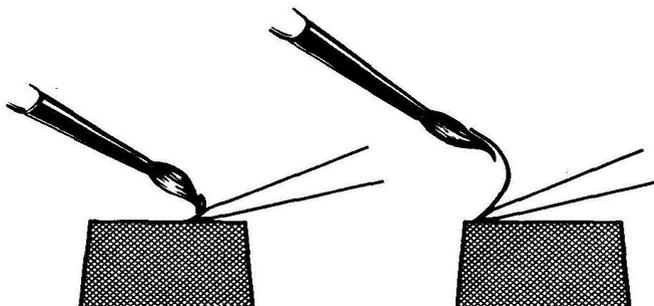


Рис. 4. Техника резания парафиновых блоков

Правильно залитые небольшие кусочки органов и тканей при оптимальном температурном режиме в помещении режутся хорошо, и срез, как правило, ложится на нож в расплавленном состоянии (угол резания прямой). При резке больших блоков и твердого материала срезы часто закручиваются. Однако этого можно избежать путем придерживания и приподнимания среза кисточкой за передний его край в процессе резки.

Нужно следить, чтобы срез не был прижат к ножу, т. к. при этом происходит его приклеивание и повреждение. Готовый срез осторожно снимают с ножа влажной кисточкой (в направлении от спинки к лезвию) и переносят либо на подготовленное предметное стекло, либо в чашку с теплой (35–40°C) дистиллированной водой. Воду предварительно кипятят, чтобы предупредить появление на нижней поверхности срезов пузырьков воздуха (который может быть растворен в воде), мешающих равномерному приклеиванию срезов к стеклу. Помещают срезы на

воду (предметное стекло) обязательно поверхностью, прилегающей к ножу, определить которую можно по характерному блеску (верхняя сторона всегда матовая).

При резке надо следить, чтобы волосы от кисточки не попадали под режущий край ножа, т. к. это приводит к повреждению лезвия. Для ряда исследований необходимо получение серийных срезов. Очень важно не перепутать очередность серийных срезов при наклеивании на предметное стекло. Для этого ленту срезов разрезают скальпелем на отдельные фрагменты и укладывают всегда в определенном порядке вдоль или поперек стекла. В зависимости от величины объекта и размера предметного стекла на одном стекле может разместиться различное количество срезов (от 2–4 до 25–30).

Для того чтобы получить хорошие гистологические срезы, необходимо уметь своевременно распознать и устранить причину, ухудшающую качество срезов.

Таблица 3

***Возможные погрешности
при изготовлении парафиновых срезов***

<i>Ошибки</i>		
<i>Данные</i>	<i>Причина</i>	<i>Устранение</i>
Крошится парафин	Слишком тверд. Медленно охлаждался при заливке Низкая температура окружающей среды Большой угол наклона ножа	Подышать на блок. Изменить угол наклона ножа. Перезалить объект
Ткань отделяется от парафина	Заливка проводилась холодным парафином Плохая пропитка материала При проводке остались следы спирта	Перезалить блок, предварительно поместив его в промежуточную среду для удаления спирта

Материал плохо режется, ткань белесоватого цвета, срезы сморщенные, плохо расправляются	Недостаточное обезвоживание ткани	Блок расплавляют в термостате и пропускают по батарее в обратном порядке до 100 % спирта Затем снова заливают по схеме
Нож «подскакивает» не срезая ткань или на срезах образуются поперечные борозды	Переуплотнение или пересушивание материала при фиксации или обезвоживании	Резать материал, поместив на него кусочек льда. Взять из архива новый и провести по схеме
Срезы сморщенные, прилипают к поверхности ножа, закручиваются	Недостаточный угол наклона ножа Высокая температура в помещении Материал залит в легкоплавкий парафин	Изменить угол наклона ножа Перед срезами материал поместить в холодильник Перезалить в более тугоплавкий парафин
Срезы покрыты полосами и легко раскрываются	Плохое качество ножа: зазубрины Загрязнение парафина: плотные соринки Наличие в ткани солей кальция	Сменить или передвинуть нож Декальцинировать Использовать специальные ножи (для керамики, синтетики, плотных тканей)
Срез прилипает к ножу	Электризация	Подышать на блок

Наклеивание срезов на предметное стекло

Для того чтобы парафиновые срезы можно было подвергнуть дальнейшей обработке, их необходимо наклеить на предметное стекло в расправленном положении. Существует несколько методов наклеивания срезов, но наиболее широко распространено приклеивание при помощи белка с глицерином.

К белку из свежего куриного яйца добавляют равное по объему количество химически чистого глицерина и хорошо взбалты-

вают (или взбивают). Приготовленный раствор фильтруют через влажный складчатый бумажный фильтр в чистый флакончик. Во избежание гниения белка к фильтрату добавляют 2–3 маленьких кусочка (с пшеничное зерно) тимола или формалин (1:100). В хорошо закрытом сосуде раствор сохраняется длительное время.

Подготовку предметных стекол к наклеиванию следует произвести до начала резки парафинового блока на микротоме, поместив на тщательно очищенную поверхность стеклянной палочкой небольшую каплю раствора белка с глицерином и растерев ее до получения равномерного слоя.

Растирание можно производить пальцем (предварительно протерев его ваткой, смоченной эфиром) или тонкой чистой льняной тряпочкой. Приготовив предметные стекла, приступают к резке парафинового блока.

Если срезы были перенесены для расправления в теплую воду, то смазанное белком с глицерином предметное стекло подводят в наклонном положении под плавающие срезы, натягивают их на стекло с помощью кисточки или препаровальной иглы и придают им правильное положение. Срезы следует располагать несколько эксцентрично, чтобы один конец предметного стекла был более свободен (при таком размещении остается больше места для нанесения обозначений и требуется меньшее количество реактивов при обработке стекол в стаканчиках).

Затем удаляют излишнюю воду (наклонив стекло и осторожно придерживая срезы за парафиновую каемку), кладут стекла на планшеты и помещают в термостат или сушильный шкаф (при 42–45°C) на 24 ч, где и происходит окончательное высушивание и приклеивание срезов. Можно высушивать и при комнатной температуре, предохраняя при этом срезы от запыления, но тогда лучше выдерживать их 36–48 ч.

Качество приклеивания срезов определяют, рассматривая их со стороны стекла, которое держат в наклонном положении. Если срезы кажутся матовыми, то приклеивание хорошее, если имеются участки, отсвечивающие, как зеркало, то между срезом и стеклом находится слой воздуха и в этом месте приклеивание не произошло. Такие срезы при дальнейшей обработке легко со-

скальзывают со стекла. Обычно воздушная прослойка появляется при недостаточной чистоте предметного стекла или слишком низкой температуре сушильного шкафа. Предотвратить соскальзывание таких срезов можно путем целлоидиновой защиты.

Если срезы перенесены с ножа непосредственно на смазанное белком с глицерином предметное стекло, то их можно наклеивать по-разному.

Влажный способ. На стекло с помощью пипетки наносят несколько капель прокипяченной дистиллированной воды и получают плавающие срезы. Затем стекло осторожно подогревают над спиртовкой и добиваются полного расправления срезов. При этом следует избегать перегревания, т. к. расплавление парафина приводит к повреждению среза.

При определенном навыке степень нагрева довольно легко определить, прикладывая нижнюю поверхность стекла к тыльной поверхности кисти (температура стекла не должна вызывать ощущения жжения). Для этого способа расправления существуют специальные электрические приборы. Значительная рабочая поверхность прибора (250 x 375 мм) позволяет располагать на столике одновременно до 45 стекол. Прибор питается от сети переменного тока (напряжение 127 или 220 В). Столик ставят рядом с микротомом. Перед началом резки снимают крышку, включают прибор в сеть.

Подготовка стекол к наклейке

На покрытые белком предметные стекла наносят несколько капель дистиллированной воды, кладут на столик. Сделанный срез кисточкой переносят на стекло. После его расправления удаляют излишнюю воду, вновь кладут стекло на столик до высыхания, после чего стекло со срезом перекладывают на стол и защищают от пыли до окраски.

Сухой способ. Плоской (не слишком мягкой) кисточкой прижимают один край среза к предметному стеклу, затем осторожно проводят по всему срезу, расправляя и раскручивая его. После этого срез прижимают кисточкой к стеклу так, чтобы между его нижней поверхностью и стеклом не оставалось пузырьков воздуха, и быстро подогревают над слабым пламенем спиртовки (не

перегреть!). В результате коагуляции белка срез прочно приклеивается к предметному стеклу и может быть сразу подвергнут дальнейшей обработке без подсушивания.

Недостаток сухого наклеивания в том, что тонкие и нежные срезы легко повреждаются и плохо расправляются, поэтому оно применимо далеко не всегда.

В тех случаях, когда нежелательно наличие белково-глицеринового слоя, срезы можно наклеивать с помощью дистиллированной воды или 30 %-го спирта. При этом способе предметные стекла должны быть обезжирены особенно тщательно, т. к. в противном случае вода неравномерно распределится по стеклу и срез плохо приклеится. Способ наклеивания довольно прост: на стекло наносят воду (или 30 %-й спирт) и на нее кладут срезы блестящей стороной книзу; затем нагревают, расправляют, удаляют воду и сушат, как описано выше.

Примечание. Пребывание срезов в теплой воде необходимо сократить до минимума, т. к. иначе могут произойти набухание соединительной ткани (особенно при фиксации в жидкостях, содержащих трихлоруксусную и пикриновую кислоты), растворение и вымывание некоторых веществ, входящих в состав тканей.

Окрашивание срезов

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, т. к. парафин обладает двоякопреломляющим свойством.

После депарафинирования 100–150 препаратов реактивы нужно менять. Депарафинированные препараты готовы к окрашиванию сразу же 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.

Таблица 4

Схема депарафинирования

<i>Порядок действий</i>	
Ксилол – 1	10–15 мин., можно в термостате при 37 °С
Ксилол – 2	3–5 мин.
Спирт 100 % – 1	1–2 мин.
Спирт 100 % – 2	ополоснуть
Спирт 96 % – 1	ополоснуть
Спирт 96 % – 2	ополоснуть
Дистиллированная вода	2 смены

Замечания по технике окрашивания

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, промывают, дифференцируют и т. д. 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.

Окрашивание срезов для обзорных целей

Различают методы окраски для обзорных целей, применяемые для получения общего представления о морфологии ткани или органа, и специальные, предназначенные для выявления определенных элементов клетки или ткани (например, комплекса Гольджи, митохондрий, эластических волокон соединительной ткани и т. д.).

Ниже рассматриваются лишь некоторые методы окрашивания для обзорных целей. Суть их обычно заключается в том, что при этом окрашиваются ядра и каким-то контрастным красителем — цитоплазма.

Ядерные (основные) красители. Для окрашивания ядер используются гематоксилин, кармин, сафранин и другие основные красители. Существует несколько способов приготовления растворов гематоксилина. Наиболее распространенным является гематоксилин Эрлиха.

Гематоксилин Эрлиха. Для его приготовления 2,0 г гематоксилина растворяют в 100 мл 96 %-го спирта и к полученному раствору добавляют 100 мл дистиллированной воды, 100 мл глицерина, 3,0 г калийных квасцов и 10 мл ледяной уксусной кислоты. Все ингредиенты нужно добавлять в указанной последовательности. Полученный раствор необходимо оставить на свету и при доступе воздуха не менее чем на 15 дней, с тем чтобы гематоксилин успел окислиться в гематеин, который и является красящим веществом. Банку с раствором при этом накрывают бумажным колпачком или сложенной в несколько раз марлей. Гематоксилин Эрлиха окрашивает ядра в синий цвет. Его используют при окрашивании срезов гематоксилин-эозином.

Железный гематоксилин Гейденгайна окрашивает в черный цвет не только ядра, но и митохондрии, темные диски скелетной и сердечной мышечной ткани и другие структуры. Для его приготовления 1 г гематоксилина растворяют в 10 мл 96 %-го спирта, добавляют 90 мл дистиллированной воды и оставляют созревать на срок не менее 4 недель. Перед окрашиванием срезы протравливают в течение 2–12 ч в 2,5 %-м растворе железозаммиачных квасцов. Раствор квасцов получают за счет 4-кратного разведе-

ния исходного 10 %-го раствора, для приготовления которого используются кристаллы квасцов только фиолетового цвета. После промывания в дистиллированной воде срезы окрашивают в течение 1–36 ч раствором гематоксилина, разведенным вдвое по сравнению с исходным. В зависимости от исследуемого материала можно использовать и большие разведения красителя. Окрашенный срез ополаскивают дистиллированной водой и дифференцируют под контролем микроскопа в растворе железоммиачных квасцов. После этого срезы промывают в водопроводной воде не менее 30 мин при частой смене воды.

Железный гематоксин Вейгерта готовят в виде двух основных растворов — раствора Вейгерта 1 и раствора Вейгерта 2. Раствор Вейгерта 1 представляет собой 1 %-й раствор гематоксилина в 90 %-м спирте (1 г гематоксилина на 100 мл спирта). Раствор Вейгерта 2 имеет следующий состав: официальный раствор хлорида железа — 4 мл, 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты (плотность 1,15–1,19) и 95 мл дистиллированной воды. Официальный раствор хлорида железа FeCl_3 — это 50 %-й раствор водного ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Перед употреблением смешивают равные объемы основных растворов. Основные растворы хранятся 3–4 мес. Смешанный раствор можно применять лишь несколько дней. Время окрашивания — 1–5 мин. Затем следует промывка водопроводной водой. Срезы можно дифференцировать 0,1 %-м раствором соляной кислоты в 70 %-м спирте, после чего их тщательно промывают водопроводной водой. Железный гематоксин Вейгерта должен окрашивать ядра в черный цвет. Если они приобретают коричневый цвет, это свидетельствует о порче красителя.

Квасцовый кармин готовят, растворяя 3–5 г аммиачных квасцов в 100 мл дистиллированной воды при нагревании, и добавляют 1 г кармина. Раствор кипятят 15 мин, охлаждают, фильтруют и добавляют 1 мл формалина. Время окрашивания — 0,5–24 ч, дифференцировка в дистиллированной воде проводится до прекращения отдачи красителя. Ядра окрашиваются в ярко-красный цвет. Окраску кармином можно проводить после импрегнации серебром или при выявлении железа.

Сафранин является прекрасным ядерным красителем, особенно для материала, фиксированного в растворах, содержащих осмий или хром. 10 г чистого сафранина или сафранина «С-extra» (качество красителя имеет очень большое значение) растворяют в смеси 155 мл 96 %-го спирта со 145 мл дистиллированной воды. Из полученного таким образом основного раствора перед употреблением берут 20 мл и добавляют 80 мл 50 %-го спирта. Время окрашивания — 24 ч. После ополаскивания в дистиллированной воде срезы дифференцируют, контролируя под микроскопом, в 0,1 %-м растворе хлористоводородной кислоты в абсолютном спирте. Затем следует промывка абсолютным спиртом, просветление в ксилоле, заключение в бальзам.

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.

Кислые красители не являются избирательно цитоплазматическими. Красители для цитоплазмы подбирают таким образом, чтобы их цвет хорошо контрастировал с окраской ядер. Для окрашивания цитоплазмы после окраски ядер гематоксилином чаще всего используется 1 %-й водный раствор эозина. Для срезов, окрашенных кармином, используют раствор пикриновой кислоты, полученный путем разведения водой насыщенного раствора пикриновой кислоты в отношении 1:3 (при комнатной температуре в 100 мл воды растворяется примерно 1,2 г пикриновой кислоты, следовательно, для получения насыщенного раствора следует взять чуть больше этого количества пикриновой кислоты). Время окрашивания — 2–5 мин. Цитоплазма клеток и эритроциты и красятся в желтый цвет.

Методика окрашивания срезов гематоксилин-эозином

Эта методика наиболее часто применяется и поэтому должна быть описана более детально. Этим методом можно окрашивать целлоидиновые срезы, депарафинированные, парафиновые или замороженные срезы. Срезы переносят в дистиллированную воду. Целлоидиновые срезы переносят из одного бюкса в другой с помощью препаровальной иглы с загнутым концом. Депарафинированные и замороженные срезы можно окрашивать на предметном стекле, наливая или сливая соответствующие растворы. Растворы красителей при этом можно сливать обратно для повторного использования.

Порядок окрашивания срезов гематоксилин-эозином следующий:

- 1) срезы переносят в дистиллированную воду;
- 2) окрашивают гематоксилином Эрлиха 2–5 мин;
- 3) промывают в дистиллированной воде;
- 4) затем промывают в водопроводной воде 3–5 мин;
- 5) осуществляют контроль под микроскопом;
- 6) дифференцируют 1 %-м раствором хлористоводородной кислоты в 70° спирте 1–2 с;
- 7) быстро переносят срезы в водопроводную воду на 30 мин при частой смене; в водопроводной воде вишневая окраска ядер сменяется синей;
- 8) осуществляют контроль под микроскопом; если хроматин и ядрышко видны недостаточно четко, то дифференцировку следует повторить (срезы можно смотреть под большим увеличением, накрыв их покровным стеклом);
- 9) промывают в дистиллированной воде;
- 10) 1 %-й водный раствор эозина — 0,5–1 мин;
- 11) промывают в дистиллированной воде (и дифференцируют, т. к. вода смывает эозин); время промывки контролируют по цвету среза;
- 12) проводят обезвоживание, осветляют в ксилоле, заключают в бальзам. В спиртах эозин также отмывается, так что промывать срезы по спиртам следует быстро. Время окрашивания в гематоксилине нужно установить на первых 2–3 срезах и затем все срезы данного блока окрашивать одинаково.

Дифференцировку в растворе хлористоводородной кислоты в спирте можно не проводить, но в этом случае структуры ядра будут менее четкими и в цитоплазме может быть синеватый фон.

Просветление и заключение срезов

Одним из основных условий, определяющих пригодность гистологических препаратов к микроскопическому исследованию, является их прозрачность. Кроме того, препараты должны быть защищены от высыхания и загрязнения. Все это обеспечивается просветлением и заключением в специальные среды, которые можно подразделить на смешивающиеся с водой (глицерин, гуммиарабик, поливиниловый спирт, желатин) и не смешивающиеся с водой (ксилол, толуол, их смеси с фенолом, эфирные масла).

Смешивающиеся с водой просветляющие вещества одновременно являются средой для заключения и приготовления постоянных препаратов.

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 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 0,5 г тимола.

Глицерин-желатин по Кайзеру в модификации Маллори

Замочить 40 г желатина в 210 мл дистиллированной воды на 2 часа. Добавить 250 г глицерина и 5 мл расплавленного фенола. Осторожно нагревать при постоянном перемешивании 10–15 мин, пока смесь не станет однородной. Хранить в холодильнике при 0–5° и перед употреблением расплавлять. Поскольку фенол оказывает разрушающее действие на препараты, окрашенные квасцовым гематоксилином, его можно заменить несколькими кристалликами тимола.

Среды, смешивающиеся с водой (кроме глицерина), предварительно нагревают на водяной бане, капают нагретой стеклянной палочкой или пипеткой на расплавленный срез, слегка подсушивают и покрывают чистым и сухим покровным стеклом. Чистой стеклянной палочкой или обезжиренным пальцем слегка прижимают покровное стекло. При этом излишки среды выдавливаются и их 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.

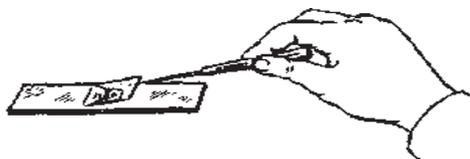


Рис. 5. Заключение препарата в бальзам

Срезы или наклеенные на стекло препараты тщательно обезвоживают в спиртах (70 %, 96 % и 100 %), а затем помещают в любые из просветляющих веществ. Установлено, что для разных исследований предпочтительнее то или иное просветляющее вещество. Так, при окраске по Нислю 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. С этой целью применяют смолы тигельного происхождения — бальзамы (канадский, пихтовый и сибирский кедровый). Все они хорошо растворяются в толуоле и ксилоле.

Метод растворения: в склянку 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 помешивая раствор и доводя до консистенции жидкого меда. Слишком жидкий раствор по мере испарения толуола вновь густеет. Приготовленный бальзам хранят в плотно закрытой посуде.

В практической патоморфологии широко используют синтетическую пластмассу — полистирол. Способ применения этого пластического материала предложен Д. С. Саркисовым и подробно изложен в руководстве Г. А. Меркулова «Курс патологогистологической техники» (1969). 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 пластичность и гибкость, устраняя все недостатки полистирола. В настоящее время в качестве пластификатора используют дибутилфталат, широко применяемый в электронной микроскопии. 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.

Примерный тест по микротехнике

Выберите не менее двух правильных ответов

1. Простые фиксаторы обладают такими свойствами, как:

- а) ускоряют процесс фиксации материала
- б) проводят мягкую фиксацию
- в) проводят медленную фиксацию
- г) проводят жесткую фиксацию

2. Достоинством сложных фиксаторов является то, что они

- а) проводят специфичную фиксацию материала
- б) проводят мягкую фиксацию
- в) проводят широкоспектральный вид фиксации
- г) проводят разнообразную фиксацию

3. Сложными фиксаторами можно назвать:

- а) комплексные по составу фиксаторы
- б) простые по составу фиксаторы
- в) фиксаторы, содержащие в своем составе 2 разных вещества
- г) фиксаторы, содержащие в своем составе не менее 3 разных

веществ

4. Процесс фиксации необходим для:

- а) остановки денатурации органелл и клеток
- б) для остановки жизнедеятельности клетки
- в) для остановки развития органелл
- г) для остановки деления клетки

5. Промывка материала необходима для:

- а) обезвоживания
- б) обеззараживания
- в) удаления фиксатора
- г) удаления примесей

6. Обезвоживание необходимо для:

- а) удаления фиксатора
- б) удаления примесей

- в) удаления воды
- г) подготовки к пропитыванию

7. Уплотнение ткани — стадия, когда проводят следующие операции с материалом:

- а) пропитка ксилолом(бензолом, толуолом)
- б) пропитка парафином, желатиной
- в) пропитка в геле
- г) пропитка сахарами

8. Изготовление срезов включает:

- а) изготовление кубика с материалом, его высадку, резку на микротоме
- б) высадку кубика с материалом, его резку на микротоме
- в) замораживание материала, резку ткани
- г) изготовление кубика с материалом, его высадку

9. Какая ошибка допущена при проводке ткани, если при резке крошится парафиновый блок:

- а) материал остыл
- б) материал плохо обезвожен
- в) материал плохо промыт
- г) материал плохо укреплен
- д) материал плохо уплотнен
- е) материал имеет слишком высокую температуру
- ж) материал перекрашен
- з) материал плохо покрашен
- е) материал плохо зафиксирован

10. Стандартная окраска парафиновых срезов — это окраска:

- а) гематоксилином
- б) эозином
- в) кармином
- г) суданом 2
- д) серебром
- е) золотом
- ж) амальгамой

11. Для окраски ядерных структур применяют краситель:

- а) гематоксилин
- б) эозин
- в) кармин
- г) судан 2
- д) серебро
- е) золото
- ж) амальгаму

12. Для окраски органелл цитоплазмы применяют:

- а) гематоксилин
- б) эозин
- в) кармин
- г) судан 2
- д) серебро
- е) золото
- ж) амальгаму

Вопросы к коллоквиуму

1. Какие этапы включает полная гистологическая проводка ткани (материала)?
2. Что важно учесть при умерщвлении животного?
3. Какие типы (приемы) умерщвлении животного известны?
4. Что включает этическая эфтаназия животного?
5. Какие этапы включает фиксация?
6. Что такое простой фиксатор? Примеры.
7. Что такое сложный фиксатор? Примеры.
8. Какие этапы включает промывка материала?
9. Какие этапы включает обезвоживание?
10. Как изготавливают спирты для батареи обезвоживания?
11. Какие этапы включает уплотнение ткани?
12. Какие этапы включает заливка в парафин?
13. Какие этапы включает заливка в целлоидин?
14. Какие этапы включает заливка в желатину?
15. Какие этапы включает подготовка предметных стекол?
16. Какие этапы включает подготовка покровных стекол?
17. Какие этапы включает высаживание и установка парафинового кубика?
18. Микротомы, виды, назначение.
19. Подготовка к работе на микротоме.
20. Микротомные ножи, особенности, подготовка к работе, заточка, правка.
21. Процесс резки (кубиков) срезов. Этапы, особенности, ошибки.
22. Наклеивание срезов.
23. Процесс окрашивания. Особенности.
24. Просветление и дифференцирование срезов.
25. Заключение в бальзам (сохраняющие среды).
26. Хранение стекол и препаратов.
27. Уход за коллекциями.
29. Неклассические схемы проводки материала.
30. Микроскопирование.

31. Виды микроскопов, виды микроскопии. Новые методы исследования срезов (клеток и тканей).
32. Фотографирование.
33. Базы микроснимков.
34. Программные продукты для анализа изображений.

Задания

1. Покажите особенности фиксации и окрашивания ткани у беспозвоночных и позвоночных животных.
2. Когда удобнее использовать целлоидин, желатину и парафин для уплотнения материала? (Приведите примеры.)
3. Для каких целей используют безводный (абсолютный) спирт?
4. Покажите все особенности работы с эмбрионами.
5. Докажите актуальность методов микротехники сегодня.
6. Что делать, если материал выпадает из парафина при резке? Как исправить ошибки?
7. Как проверить, достаточно ли промыт и обезвожен орган при проводке? Почему это важно?
8. Когда этап проводки можно пропустить?
9. Если парафин не очень качественен, что надо сделать, чтобы он работал хорошо?
10. Можно ли «довести до кондиции» перекрашенный срез? Как это сделать?
11. Как выбрать время окраски препарата в гематоксилине и эозине, какие предварительные действия должны быть проведены?
12. Что надо не забыть при фотографировании препарата?
13. Как используют разные виды микроскопирования?
14. Всегда ли работает гистохимия?

Вопросы для подготовки к курсовому экзамену

1. Виды микропрепаратов.
2. Техника приготовления гистологических препаратов. Этапы приготовления.
3. Гистологические этапы: взятие, маркировка и фиксация материала.
4. Техника приготовления гистологических препаратов.
5. Этапы приготовления гистологических препаратов.
6. Фиксация материала. Ее особенности.
7. Промывка и обезвоживание.
8. Проводка материала и приготовление срезов.
9. Виды микротомов.
10. Резка препаратов.
11. Окрашивание, основные виды красителей.
12. Заключение среза.
13. Фотографирование и зарисовка.
14. Морфометрические методы исследования. Задачи и возможности метода. Автоматизированные системы обработки изображений.
15. Ядерно-цитоплазматическое отношение как показатель функционального состояния клетки.
16. Проточная цитометрия: основные принципы метода. Проточная ДНК-цитометрия. Задачи и возможности метода.
17. Использование метода для изучения периодов митотического цикла в клетках различных тканей.
18. Проточная цитометрия: основные принципы метода. Метод иммунофенотипирования. Задачи и возможности метода.
19. Использование метода иммунофенотипирования и моноклональных антител для исследования клеточного звена иммунитета.
20. Иммуногистохимический метод исследования. Основные принципы метода. Задачи и возможности метода.
21. Применение иммуногистохимического метода для определения гистогенетического типа ткани.
23. Особенности метода клеточных культур.

Литература по курсу

1. Меркулов, Г. А. Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. — Л. : Медицина, 1969.
2. Заварзин, А. А. Основы сравнительной гистологии / А. А. Заварзин. — Л. : ЛГУ, 1985.
3. Гистология / под ред. В. Г. Елисеева, Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. — М. : Медицина, 1983.
4. Гистология: учебник / под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Чельшева. — М. : ГЭОТАР-МЕД, 2002.
5. Кузнецов, С. Л. Гистология, цитология и эмбриология: учебник для студентов медицинских вузов / С. Л. Кузнецов, Н. Н. Мушамбаров. — М., 2012.
6. Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии и эмбриологии / под ред. Ю. А. Афанасьева, А. Н. Яыцковского. — М. : Высшая школа, 1999.
7. Гистология. Комплексные тесты: ответы и пояснения / под ред. С. Л. Кузнецова, Ю. А. Чельшева. — М. : Геотар, 2001.
8. Атлас по гистологии, эмбриологии и цитологии / С. Л. Кузнецов и др. — М., 2001.
9. Быков, В. Л. Частная гистология человека / В. Л. Быков. — СПб., 2000.
10. Эмбриональное развитие человека / под ред. В. В. Гемона. — М., 1999.
11. Гистологическая техника: учеб. пособие / под ред. В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В. Н. Ноздрина, В. Н. Артемьева. — Омск — Орёл : Омская областная типография, 2006.

Оглавление

Введение.....	3
Техника приготовления гистологических препаратов.....	6
Умерщвление экспериментальных животных.....	9
Взятие материала.....	10
Фиксация материала.....	12
Задачи и правила фиксации.....	12
Виды фиксаторов.....	13
Промывание.....	17
Обезвоживание.....	18
Пропитывание и заливка.....	24
Заливка в парафин.....	24
Методика пропитывания.....	27
Микротомы и работа с ними.....	30
Изготовление срезов.....	36
Наклеивание срезов на предметное стекло.....	39
Окрашивание срезов.....	42
Примерный тест по микротехнике.....	51
Вопросы к коллоквиуму.....	54
Задания.....	55
Вопросы для подготовки к курсовому экзамену.....	56
Литература по курсу.....	57

Учебное издание

МИКРОТЕХНИКА

Практикум

Составитель

Комарова Ирина Павловна

Редактор, корректор М. Э. Левакова
Верстка Е. Б. Половковой

Подписано в печать 12.12.13. Формат 60×84 ¹/₁₆.
Усл. печ. л. 3,49. Уч.-изд. л. 3,0.
Тираж 50 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.
150000, Ярославль, ул. Советская, 14.

