

**ФИКСАЦИЯ. Требования,
предъявляемые к фиксирующим
жидкостям. Ошибки при
фиксации, их последствия.
Устранение побочного действия
формалина. Фиксаторы,
применяемые в
гистохимической практике**

**Заведующая ПАО ГБУЗ СО «Городская больница № 5,
г.Каменск-Уральский» к.м.н Баранова Е.Ю.**

☺ Лаборант-гистолог должен знать всю цепь действий по приготовлению гистологических препаратов:

- ▶ забор материала (вырезка)
- ▶ фиксация
- ▶ Обезвоживание и заливка в заливочные среды
- ▶ Приготовление гистологических срезов
- ▶ Окрашивание срезов
- ▶ Заключение материала в бальзам и другие среды



Важнейшим условием получения высококачественных препаратов являются возможно более раннее получение материала, минимальное травмирование ткани и адекватная фиксация. Недопустимо - сдавливание, промывание водой, очистка поверхности органа особенно инструментами, пальцами.

- Гистология - это наука о строении и функциях тканей живых организмов

Современная гистология делится на два основных раздела:

- ▶ общая гистология – учение о ткани)

- ▶ частная гистология – учение о микроскопическом строении органов

Основной исследуемый объект гистологии и гистологов – клетка и ткань

- Гистологическое исследование - это исследование структуры ткани на предмет выявления морфологических патологий или изменений ткани.

Для чего нужен гистологический анализ?

- Выявление патологических изменений в ткани при различных заболеваниях - патологическая анатомия, онкология, гастроэнтерология, хирургическая патология, урология, гинекология, пульмонология и многое другое

- Установление причины смерти человека - Судебная медицинская экспертиза

- ▶ При микроскопическом (гистологическом) исследовании обнаруживают начальные изменения в клетках и тканях больных органов

Где проводится гистологическое исследование?

- Патологоанатомические бюро, патологоанатомические отделения больниц с гистологической лабораторией
- Онкологические диспансеры
- Бюро судебно-медицинской экспертизы с судебно-гистологической лабораторией
- Патоморфологические (гистологические) лаборатории медицинских университетов и НИИ.
- Кто проводит?
 - Врач-патологоанатом (судебно-медицинский эксперт с подготовкой по судебной гистологии) и лаборант - гистолог



Как проводится гистологическое исследование ?

1. Забор материала для исследования (врач)
2. Обработка материала и получение гистологического препарата (лаборант)
3. Микроскопическое исследование препарата врачом-патологоанатомом и постановка диагноза

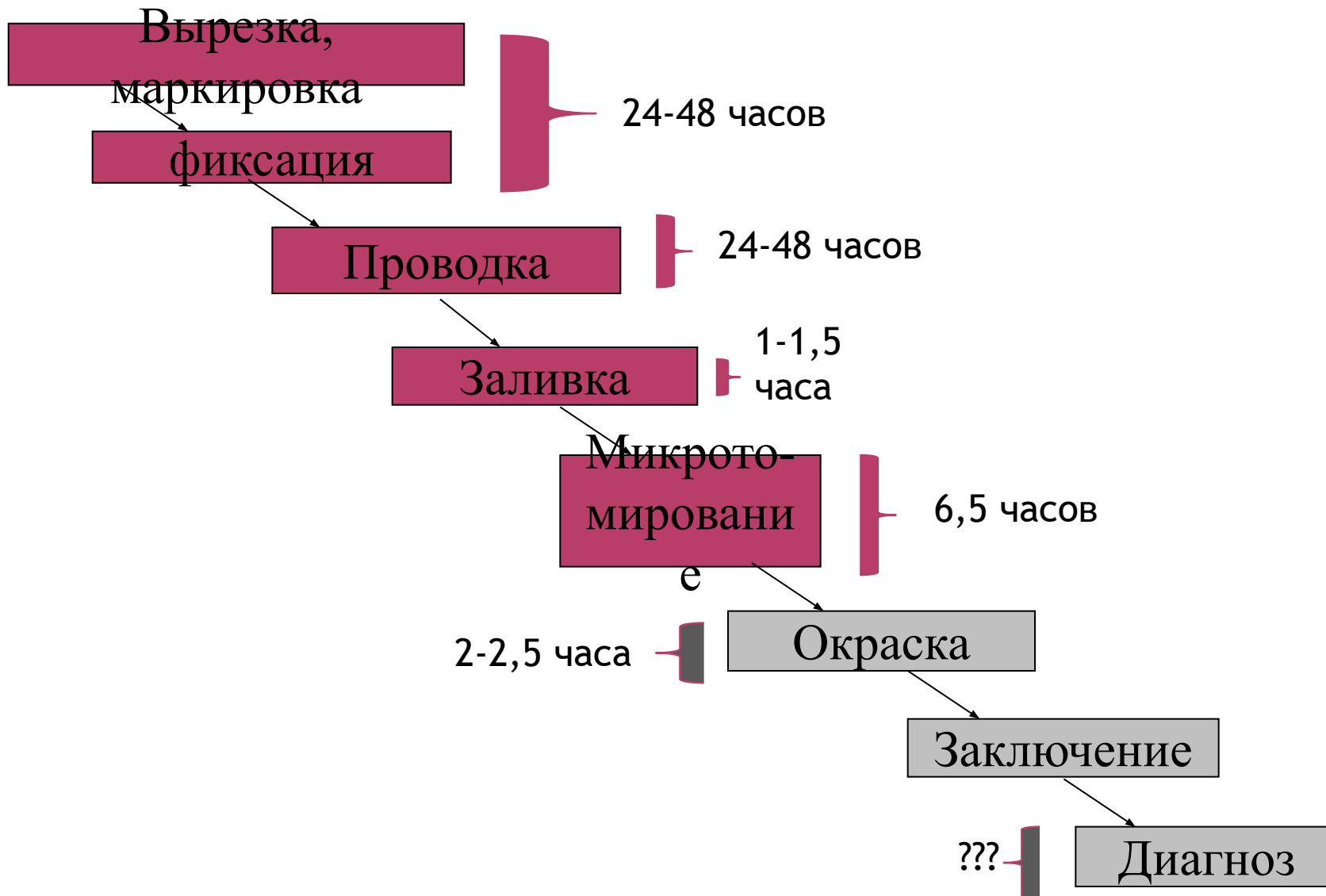
Забор материала для гистологического анализа:

Аутопсия - посмертное вскрытие и исследование тела, в том числе внутренних органов.

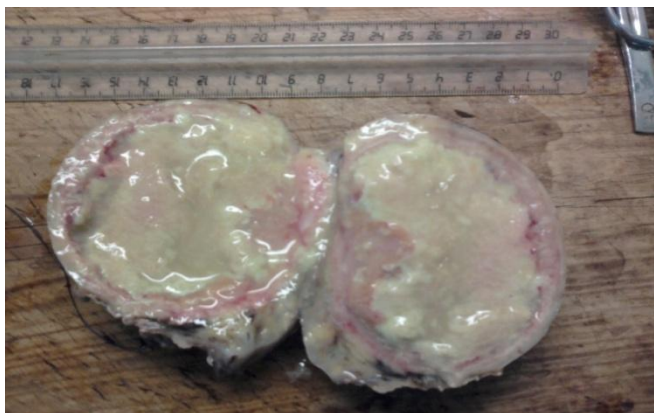
Биопсия - прижизненное иссечение (в том числе при эндоскопии) кусочка ткани или органа для микроскопических исследований с диагностической целью.

Операционный материал - кусочки ткани, органы или части органов, который получают во время операций. В т.ч. плацента.

Обработка материала и получение гистологического препарата



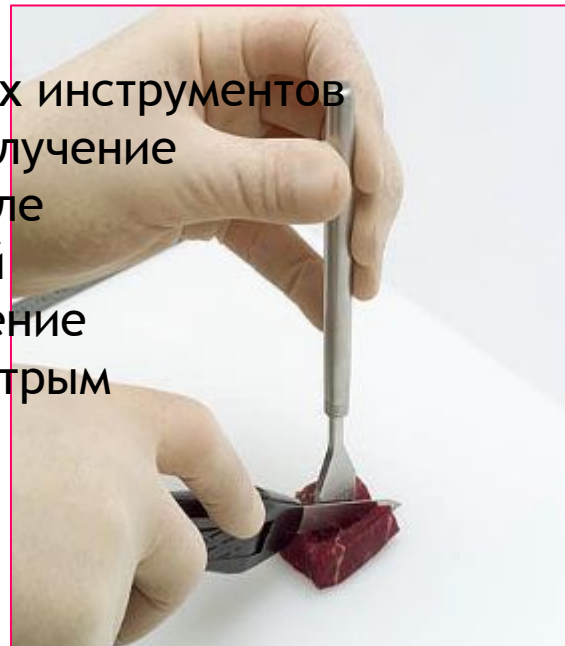
Что является объектом гистологического исследования ?



Гистологический препарат

Процесс вырезки

С помощью традиционных инструментов - скальпелей и ножей получение образцов органа для последующей гистологической проводки. Важно - иссечение кусочков производить острым инструментом!





Доска для
вырезки
операцион-
ного материала
в патолого-
анатомическом
отделении)

Доска для вырезки хорошо закрепляет материал на поверхности и позволяет получать серию одинаковых тканевых пластинок заданной толщины (толщина вырезанных образцов нативного материала 1,5 – 2 мм)

Тримминговые, аутопсийные ножи, скальпели, сменные лезвия, держатели, анатомические пинцеты - современные инструменты для вырезки в патологоанатомических отделениях



- ▶ Просты и удобны в использовании
- ▶ Легко дезинфицируются



Перчатки, предохраняющие от порезов

Процесс вырезки

ВАЖНО!



Толщина образца ткани для исследования должна быть не более 1-2-5 мм

- ▶ В противном случае качество последующей обработки ткани будет ухудшаться

Вырезанные кусочки ткани и органов переносятся сразу же в фиксирующие жидкости !

1-й этап гистологической проводки материала- ФИКСАЦИЯ
материала

Фиксация - уплотнение ткани за счет коагуляции белков.

► Цель Ф. - закрепление тканевых структур в том состоянии, в котором они находились в момент погружения в фиксирующую жидкость и предохранение их от дальнейшего разложения (трупного аутолиза)

► Такое закрепление структур достигается денатурацией (коагуляцией) белков химическим путем

Станция вырезки



Лаб.посуда с фиксатором



► **Требования, предъявляемые к фиксирующим жидкостям**

1. **Быстрое проникновение в структуры ткани**
2. **«Мягкое» воздействие, без грубых нарушений тканевых структур (сморщивание, чрезвычайное уплотнение, ломкость)**

► **Механизм Ф.**

Фиксирующее действие формалина и спирта связано с обезвоживанием тканей и природа белков при этом изменяется мало.

Применение фиксаторов с большей осаждающей (коагулирующей) силой может приводить к новым изменениям белков ткани. Чем меньшую деформацию будут претерпевать тканевые структуры при фиксации и чем быстрее и глубже будет их действие на ткань, тем полнее и лучше будет фиксация.

► **Полноценная Ф. материала проходит при соблюдении следующих требований:**

1. **После вырезки кусочек немедленно погружают в фиксирующий раствор**
2. **Объем фиксатора должен превышать объем материала в 10-20 раз**
3. **Недопустимо повторное использование фиксатора**
4. **Для каждого фиксатора и кусочка следует соблюдать установленное время фиксации (в среднем, 24 часа)**
5. **Материал нужно помещать так, чтобы обеспечить равномерное пропитывание его со всех сторон.**

Равномерная серая окраска и одинаковая консистенция тканей свидетельствует об окончании фиксации



► Простые (однокомпонентные)

1. Формалин 4% (1 часть 40% формалина+9 частей водопроводной воды)

2. Буфер с 10 % содержанием формалина - универсальная фиксирующая жидкость.

Продолжительность фиксации – 24-48 часов при температуре +20 С.

3. Этиловый спирт (80%-96% и абсолютный спирт) – универсальный реагент для фиксации. Применяется для выявления гликогена, железа, амилоида (гистохимия), но растворяет жир! Продолжительность фиксации – 2-24 часа при температуре +20 С.

4. Ацетон («коммерческий 100% ацетон»)– используют для сокращения времени фиксации («срочные» биопсии). Время Ф.= 2 часа

► **Сложные фиксаторы (смеси)**

1. Жидкость Карнуа (фиксатор Карноа) – универсальный фиксатор для гистологических и цитологических исследований, кроме выявления жиров

Состав: спирт 96%-100% - 60 мл+ хлороформ 30 мл+ ледяная уксусная кислота 10 мл. Продолжительность Ф.- 1-2 часа

2. Для выявления жиров используется фиксирующая жидкость *КАЛЬЦИЙ-ФОРМОЛ БЕЙКЕРА*

Состав: 40% формалин 10 мл+ 90 мл дистиллированной воды+ 1 гр хлорида Са)

В настоящее время для лабораторной гистологической работы применяются готовые сложные фиксирующие жидкости, особенно в тех случаях, когда материал предназначен для нескольких видов исследований: иммуноморфологического (ИГХ), гистологического, гистохимического. Но и используются простые, проверенные временем реагенты

Современные коммерческие фиксирующие жидкости (готовые к применению)

Буфер с 10 % содержанием формалина	Универсальный реагент для всех видов фиксации (гистология, гистохимия, игх)	гистология
Дюбоск Бразиль	Быстрая фиксация с высокой проникающей способностью. Рекомендован для биопсий	Гистология / цитология
Фиксатор Карноа	характеризуется высокой избирательностью к гликогену, рекомендован для гистохимии	Гистология / цитология
Фиксатор Карсона	рекомендован для электронной микроскопии	Цитология
Иммунофикс	рекомендован для иммуногистохимических исследований	гистология

ФИКСАЦИЯ ДЛЯ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гистохимическая реакция - биохимическая реакция, протекающая между органическими и неорганическими веществами ткани и окрашивающими реактивами. При этом в ткани образуются окрашенные в разный цвет «продукты» гистохимической реакции. Основана на введении в ткани химических реагентов с заданным значением pH, так как разные ферменты и БАВ требуют для окрашивания разные значения pH

pH 7,0 -нейтральная среда, pH менее 7,0 -кислая среда, pH более 7,0 - щелочная среда

- ▶ ГХ широко применяется в современных лабораториях, дает высокоточный результат
- ▶ Но ! Необходима строгая специфичность, особая точность и чистота проведения

Для ГХ применяются:

1. Буфер с 10-12 % содержанием формалина - универсальная фиксирующая жидкость. Это нейтральный (забуференный до pH 7,0) 10-12% формалин.

Продолжительность фиксации – 24-48 часов при температуре +20 С.

Состав: 1 литр 40% формалина+100 гр карбоната кальция или магния, либо смесь этих солей (доломит), дать настояться 24 часа + 9 литров водопроводной воды

2. Реактив Буэна (Боуин - коммерческое название)

Состав: насыщенный раствор пикриновой кислоты 75 мл+ нейтральный 40% формалин ледяная уксусная кислота 5 мл

3. Жидкость Карнуа - кроме жиров!

Посредством ГХ в тканях можно выявить нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, полисахариды, гликогены, жиры и ферменты

ВОЗМОЖНЫЕ АРТЕФАКТЫ И ОШИБКИ, СВЯЗАННЫЕ С ФИКСАЦИЕЙ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

1. «Формалиновый пигмент». При Ф. формалином, особенно кислым (рН менее 7,0) появление в микропрепарате после окрашивания темно-коричневого пигмента в виде зернышек или глыбок (результат реакции формалина с гемоглобином ткани).

Устранение: 1 вариант- поместить неокрашенный микропрепарат на 15-20 минут в 1-5 % раствор аммиака или 70% спирт, после промыть водой, окрасить и заключить под покровное стекло

2-й вариант - 10 минут в смеси 1% раствора КОН (гидрооксид калия) + 80% этанола (1:25), после того препарат промыть в воде, окрасить, заключить под покровное стекло

2. Чрезмерное уплотнение ткани («пересыхание») - в результате слишком продолжительной фиксации.
Устранение - кусочки ткани помешают после фиксирующей жидкости на 1-2 часа в 10% раствор лимонной кислоты, в результате чего материал становится более мягким и пригодным к дальнейшим манипуляциям

3. Кристаллический осадок - при применении ртутьсодержащих фиксаторов (В 5:формалин+хлорид ртути, жидкость Ценкера)
Устранение- обработка препарата йодированным 70% спиртом

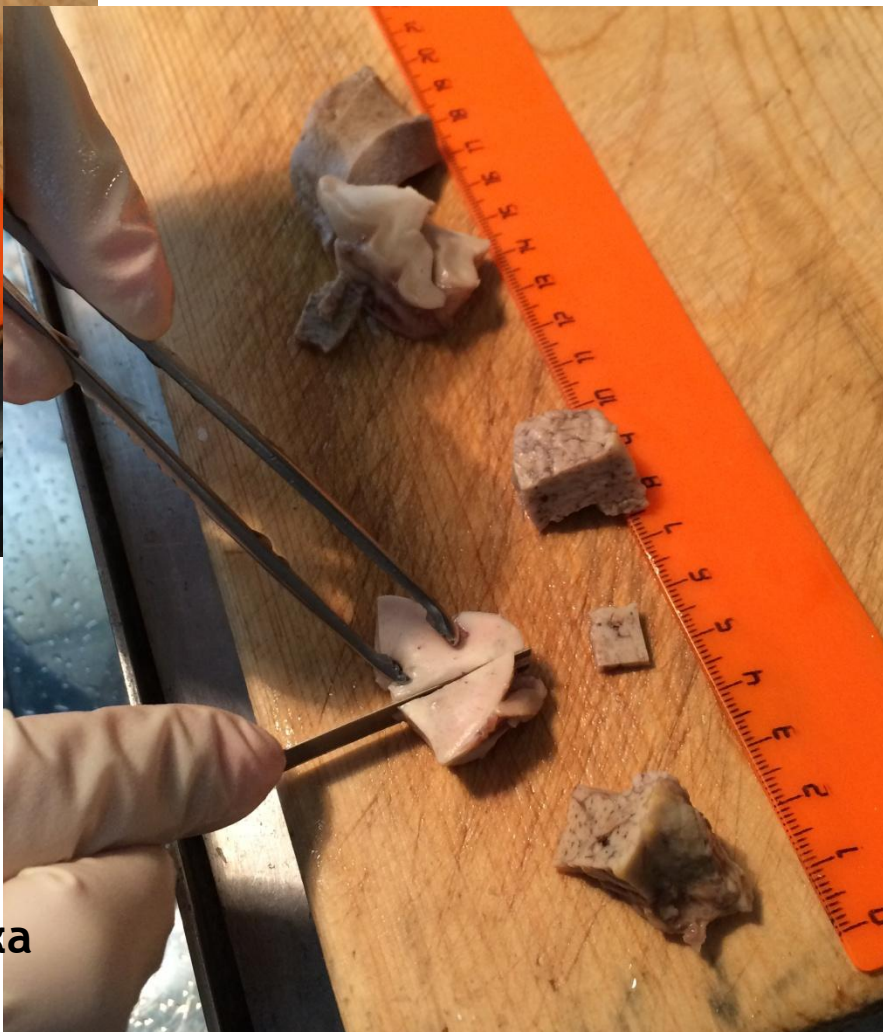
**ОХРАНА ТРУДА И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ РАБОТЫ С
ФИКСИРУЮЩИМИ ЖИДКОСТЯМИ**

(альдегиды, спирты, в.тч. метанол, ртуть, ацетоны) Все фиксирующие вещества токсичны и ядовиты !

Все манипуляции в вытяжном шкафу, используя СИЗ!

Гистологическая техника I этап - взятие и фиксация материала

Вырезка фиксированного материала.
Показатель правильно проведенной Ф. -
однотонная серая окраска ткани



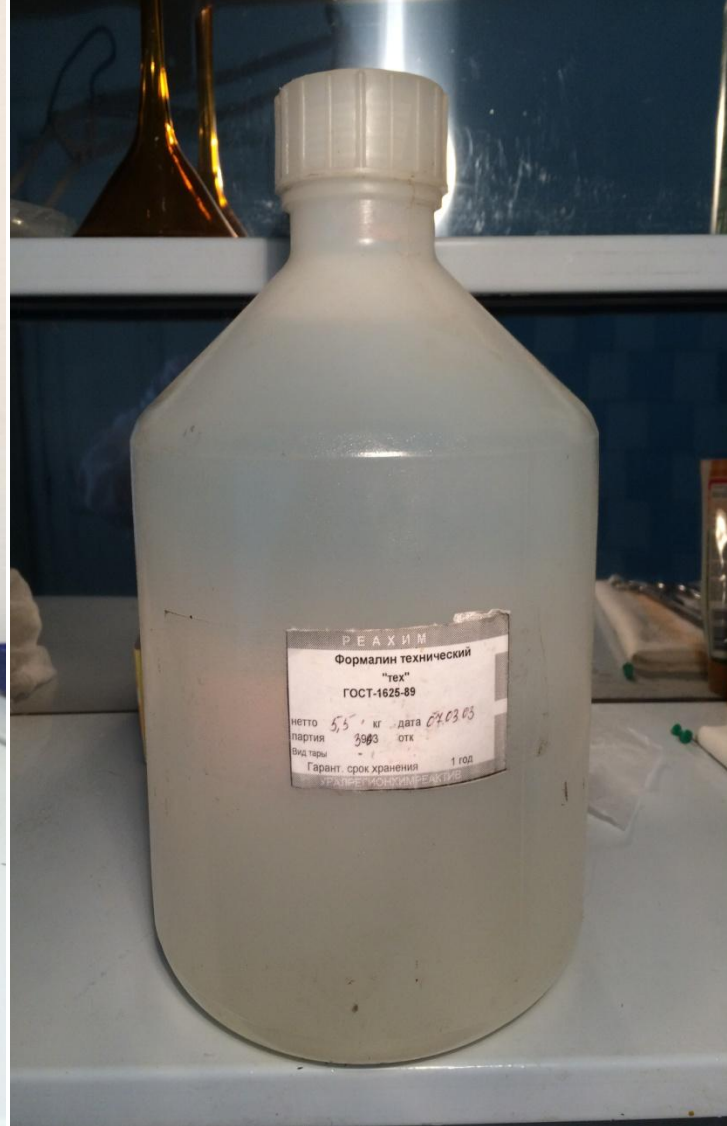
Толщина вырезанного кусочка
1,5-2 мм, площадь 2-3 кв.см.

Гистологическая техника I этап - взятие и фиксация материала

ФИКСАЦИЯ



После вырезки маркированные кусочки немедленно помещены в достаточный объем фиксирующей жидкости



ФИКСИРУЮЩИЕ ЖИДКОСТИ И РЕАКТИВЫ

Гистологическая техника I этап - ВЗЯТИЕ И ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА



БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ

