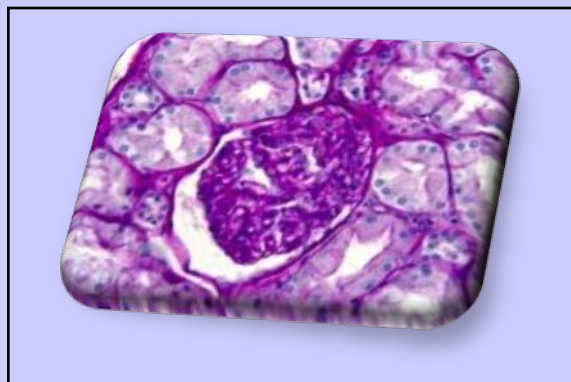
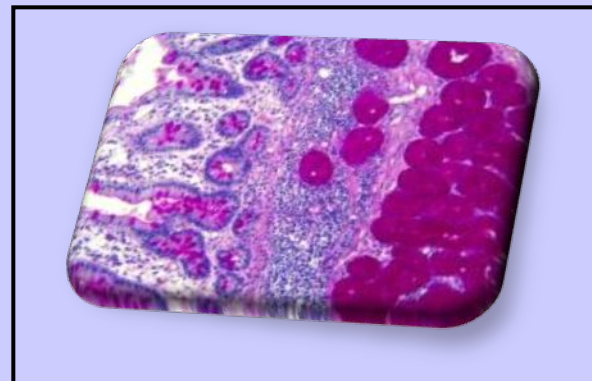
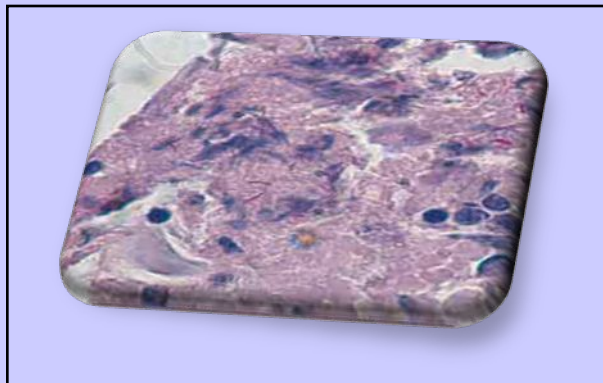


ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



Терминология

- *Гистология* - это наука о строении, развитии и жизнедеятельности тканей многоклеточных организмов и человека.
- *Гистологический анализ* – 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

Установление причины смерти человека -
Судебная медицинская экспертиза

Где проводится гистологический анализ?

Патологоанатомические отделения (ПАО)

Бюро судебно-медицинской экспертизы (СМЭ)

Онкологические диспансеры

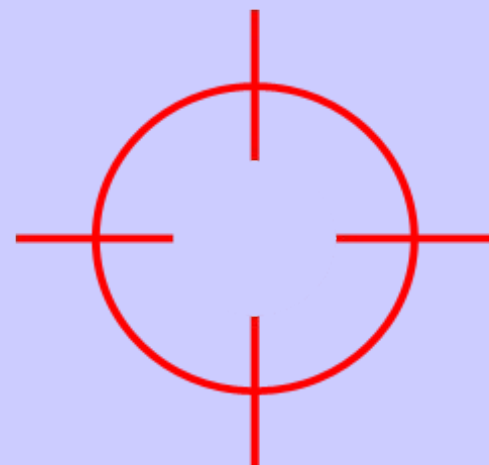
НИИ онкологии

Гистологические лаборатории больниц

Гистологические лаборатории медицинских университетов

Что является объектом гистологического анализа?

Гистологический препарат



Как проводится гистологический анализ?

Забор материала для исследования

Обработка материала и получение гистологического препарата

Микроскопическое исследование препарата врачом-гистологом и постановка диагноза

Забор материала для ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

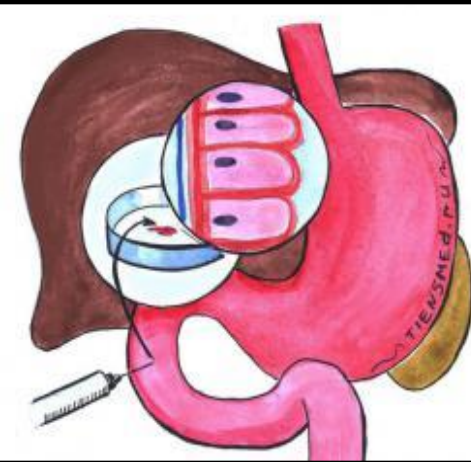
Аутопсия (*некропсия*) – посмертное вскрытие и исследование тела, в том числе внутренних органов.

Биопсия (*эксцизионная, инцизионная, тонкоигольная аспирационная*) – прижизненный забор клеток или тканей для микроскопических исследований с диагностической целью.

-эксцизионная. Изъятие всего органа во время операции

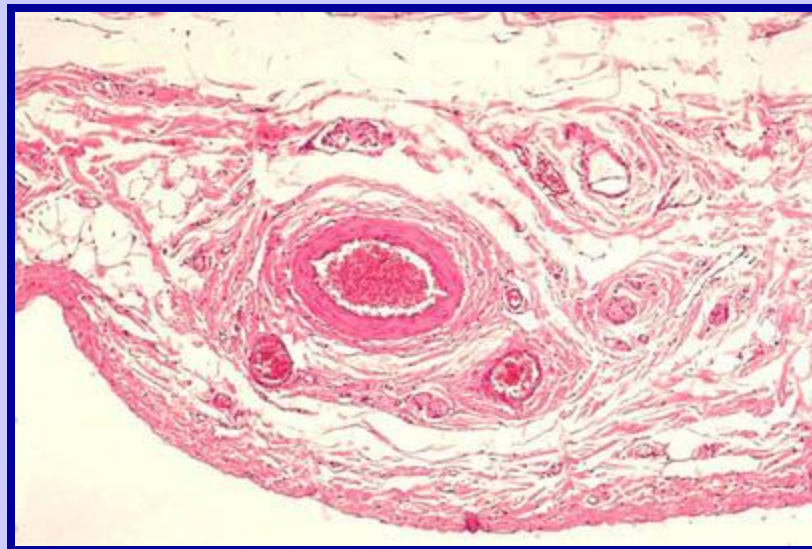
-инцизионная. Изъятие части образования или органа

-тонкоигольная аспирационная. Забор столбика ткани при помощи прокола полрой иглой



Зачем нужна фиксация материала?

- Фиксация материала имеет важное значение
- Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение



ФИКСАТОРЫ

ПРОСТЫЕ

* Формалин (наиболее часто)

10% (так же 5 и 20%) р-р на водопроводной воде, т.к. дистиллят вызывает набухание тканей.

Скорость фиксации 24-48 часов

Высокая проникаемость;

хорошо фиксирует даже крупные фрагменты;

Возможность длительного хранения (годами) без потери структуры тканей.

Этиловый спирт

для ГХ, т.к. фиксирует белок с min изменениями.

Сохраняет гликоген, железосодержащий пигмент, Са, мукоидные в-ва, мочевую к-ту;

Не требует промывки и обезвоживания перед заливкой.

искажает строение рыхлых и отёчных тканей, т.к. быстрая фиксация

Метиловый спирт

Оптimalен для мазков крови группа А!!!

СЛОЖНЫЕ

Жидкость Буэна

пикриновая к-та+конц. формальдегид+ледяная уксусная к-та

Скорость фиксации 24 часа

Для всех тканей. Часто используется в экспериментах и эмбриологии, т.к. не деформирует ткани

Жидкость Карнуа

спирт+хлороформ+ледяная уксусная к-та

Ускоренная фиксация (3-4 часа). Толщина образца до 4 мм.

Хорошо сохраняет структуру ядра и применяется для быстрой фиксации и ускоренной проводки.

Фиксаторы с сулемой, спирт+формалин в разных пропорциях

* ФОРМАЛИН

ЗАВОДСКОЙ

НЕЙТРАЛИЗОВАННЫЙ
(ЗАБУФЕРЕННЫЙ)

Фосфаты.
Мел, углекислый магний

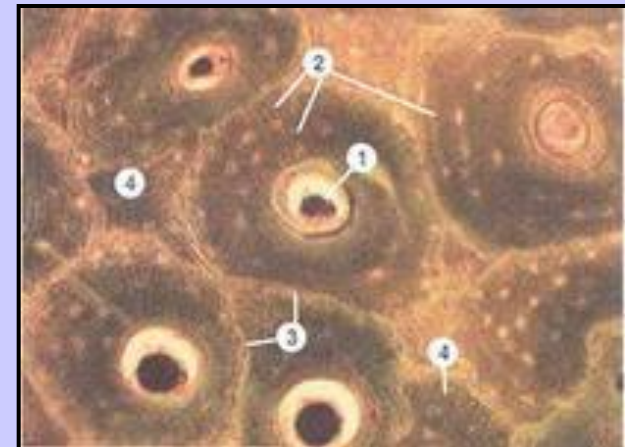
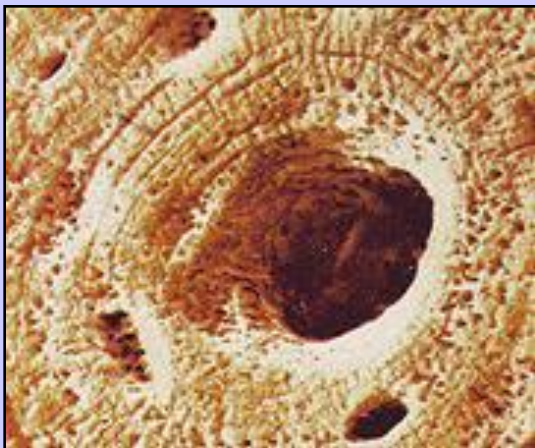
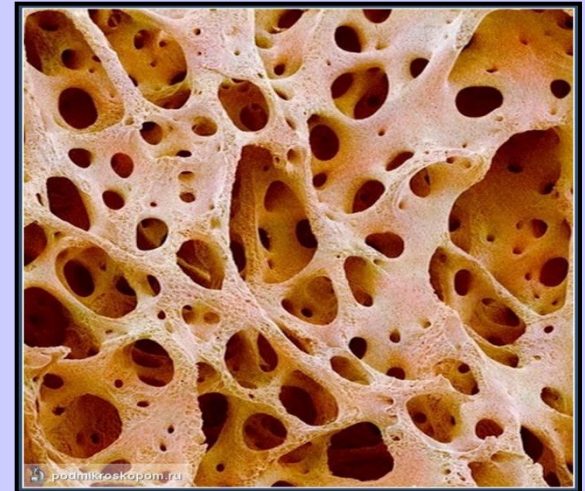
Содержит примеси:

Метиловый спирт, муравьиную к-ту, иногда ацетон.

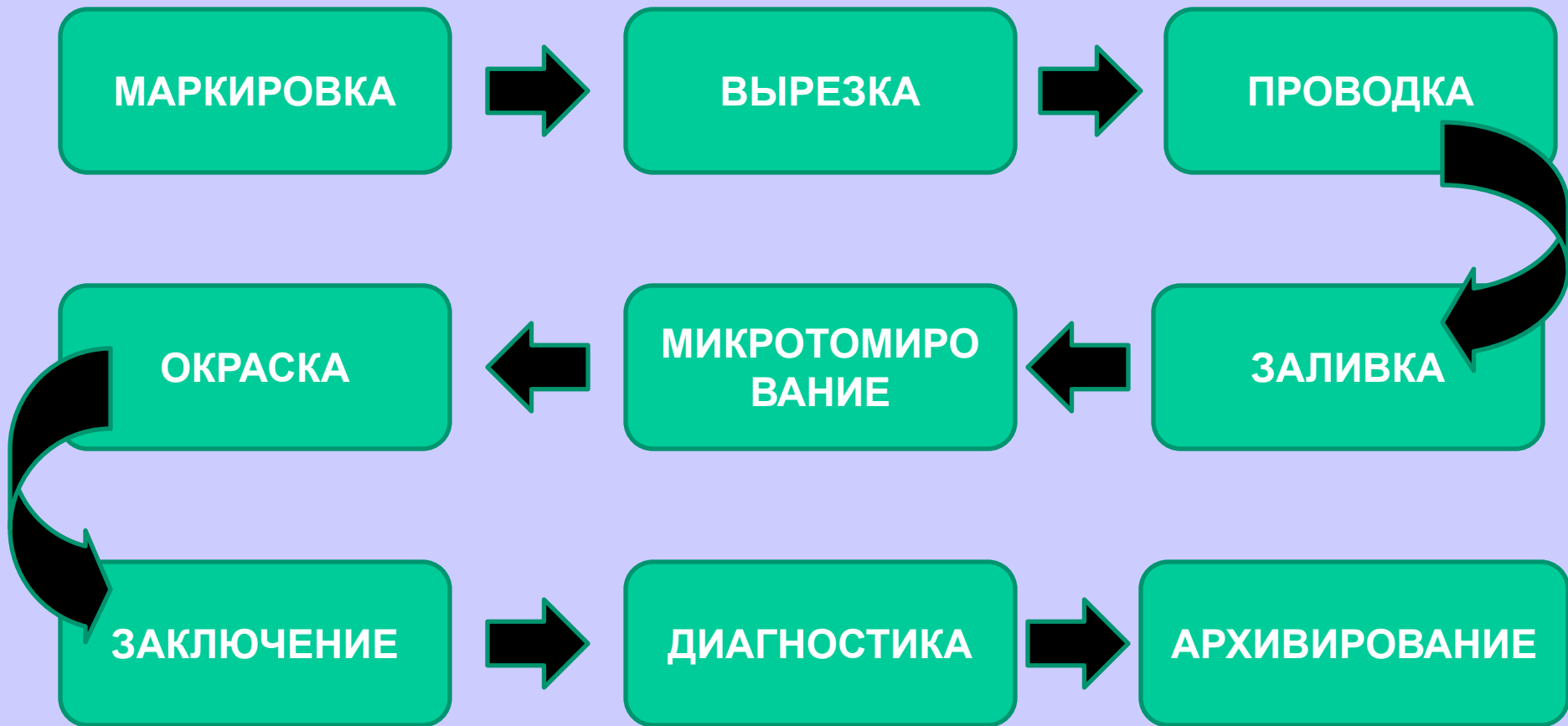
На холоде, на свету формальдегид полимеризуется и выпадает в виде белого осадка (параформальдегиды). Концентрация снижается. Формалин не пригоден.

При некоторых методах окраски (серебрении и др.) формалин должен быть нейтральным, т.е. не содержать кислот.

ДЕКАЛЬЦИФИКАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ



Обработка материала и получение гистологического препарата



МАРКИРОВКА

Маркировка- присвоение материалу определенного порядкового номера

МАРКИРОВКА



Маркеры устойчивые к реагентам



Краска для маркировки тканей



«Алмазный» карандаш



Принтеры для маркировки кассет и стекол



ВЫРЕЗКА

Требования к рабочему месту лаборанта гистолога

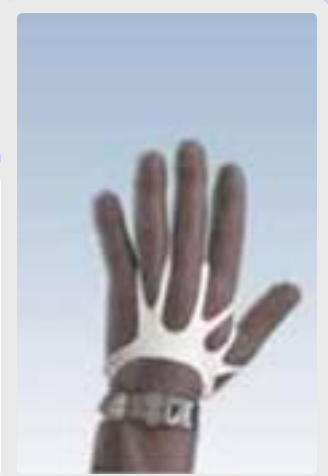
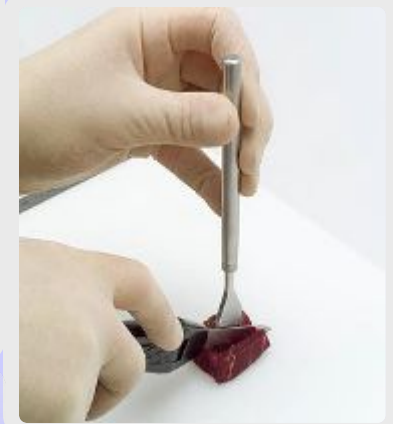
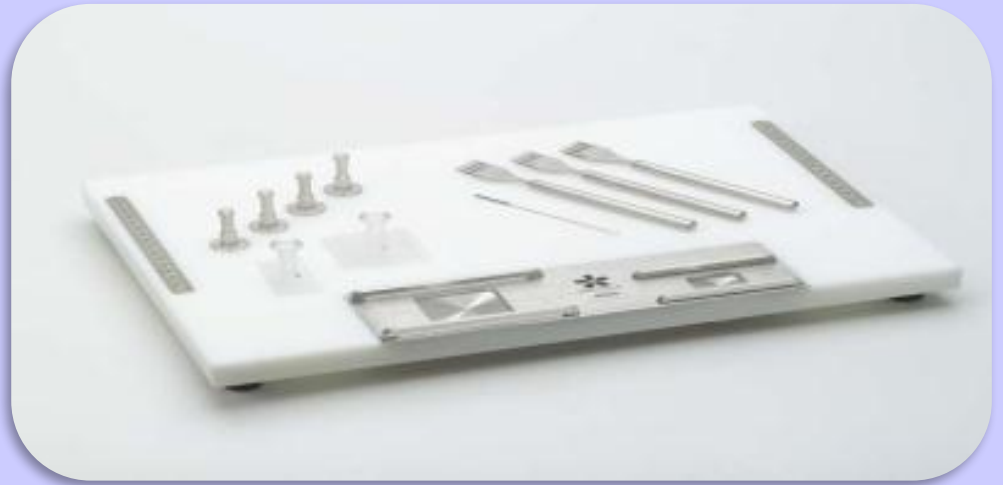
- *Гистологическая (патоморфологическая) лаборатория размещается в типовом или специально приспособленном помещении. Она должна быть оснащена необходимым оборудованием, инструментами, лабораторной посудой и химическими реактивами.*
- *Лабораторная мебель, выполненная из древесины малоприспособна для работы с многими токсичными и пожароопасными реактивами, используемыми в патоморфологии. Поэтому предпочтение следует отдавать специальной лабораторной мебели из металла и пластика, которая снабжена выдвижными частями, подводкой воды, вакуума, воздуха и газа...*
- *(«Микроскопическая техника. Руководство»; под ред. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. изд. Медицина 1996 год)*

Стол лаборанта-гистолога



С помощью традиционных инструментов – скальпелей и ножей получение образцов ткани стандартной толщины труднодостижимо





Процесс вырезки

ВАЖНО!

**Толщина образца ткани для исследования
должна быть
не более 2-7 мм**

(часто определяется фиксатором, типом ткани
и вариантом последующей окраски)



**В противном случае качество последующей обработки ткани
будет варьировать**

БИОПСИЙНЫЕ КАССЕТЫ



БИОПСИЙНЫЕ ПРОКЛАДКИ



БИОПСИЙНЫЕ МЕШОЧКИ



Проводка

- *Гистологическая проводка* - ЭТО процесс последовательного замещения воды и жиров ткани на парафин.

Результат проводки: получение фиксированного и обезвоженного образца ткани, который в дальнейшем может быть залит в парафиновый блок и подвержен микромированию.

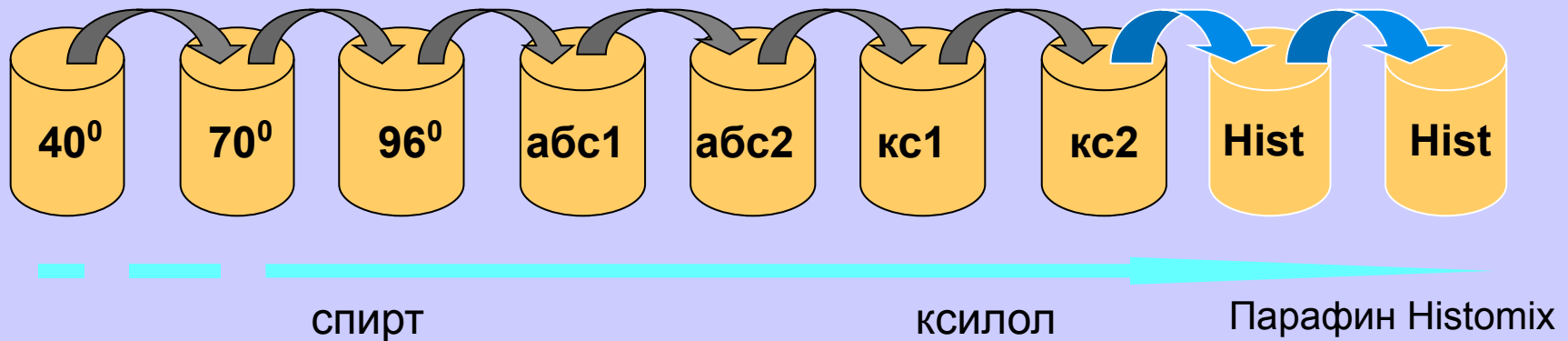
Этапы гистологической проводки

1. Фиксация тканей. Обычно в формалине.

2. Обезвоживание тканей

в спиртах восходящей крепости и ксилоле.

3. Пропитка тканей парафином.



Типы проводки

Спирт этиловый –ксилол чаще всего встречается

Спирт этиловый – хлороформ

Изопропиловый спирт

Могут быть использованы толуол, ацетон, бензол в различных вариациях

Проводка вручную



Традиционно используют марлю и банки с притертой крышкой!

Недостатки проводки вручную

- Длительный процесс проводки
- Требуется постоянного внимания лаборанта
- Нестабильное, часто низкое качество проводки
- Испарение реагентов загрязняет атмосферу в лаборатории
- Очень трудоемкий процесс
- Возможна потеря образцов

Проводка автоматическая

Карусельного
типа



Вакуумные
процессоры



Гистоконвейеры



Заливка

Заливка – это процесс заключения проведенного образца в парафин (редко целлоидин). Результат заливки – это парафиновый блок, в который заключен образец ткани. Этот блок далее поступает на этап микротомии.

Парафиновые среды

Приготовленные вручную



Парафин

Воск

(пчелиный или
зуботехнический)

Готовые



Как приготовить парафин для заливки вручную?

- Расплавление парафина и воска
- Охлаждение полученной смеси холодной водой
- Тщательное перемешивание полученной смеси руками

И ТАК 5-10 РАЗ ДО ПОЛУЧЕНИЯ
ГОМОГЕНЕЗИРОВАННОЙ ПАРАФИНОВОЙ СМЕСИ



Недостатки

- Процесс очень трудоемкий;
- Лаборант тратит на приготовление среды для заливки до 30% своего рабочего времени;
- Лаборант подвергает свое здоровье опасности
- Качество воска и парафина варьирует, а следовательно, варьирует и качество среды



ЗАПАТЕНТОВАНО В РФ

HISTOMIX

Вес нетто: 1 кг Произведено в России **1 кг**
продукт предназначен для in vitro диагностики



парафиновая среда для гистологической заливки тканей | **BiVitrum** | www.biovitrum.ru

Как традиционно заливают ткани в лаборатории?

Помещение объекта в формочку

Заливка парафином, разогретым до температуры 58°-65°

Ориентация кусочка ткани с помощью подогретой препаровальной иглы

Охлаждение залитых объектов с целью получения лучшей консистенции парафинового блока.
Для этого формы опускают в холодную воду или помещают на охлажденную поверхность

Вырезка блоков из затвердевшего парафина

Приклеивание приготовленных блоков с помощью подогретого шпателя к деревянному блоку

Маркировка блока

Заливка вручную



Недостатки

- Занимает много времени
- Требуется постоянное внимание лаборантов
- Трудно выполнять одному
- Нестабильное качество заливки
- Очень трудоемкий процесс

Заливка автоматическая



Микротомия

Микротомия – это получение тонких срезов из парафинового блока, в котором заключен образец ткани.

Криотомия – это получение тонких срезов из замороженного кусочка ткани при необходимости постановки срочного диагноза (срочная биопсия).

Полученный срез (срезы) наносится на предметное стекло для дальнейшего окрашивания и получения гистологического препарата.

Микротомия

Микротомы – это приборы, с помощью которых получают срезы тканей, залитых в парафиновые среды, а также замороженных и нефиксированных. По принципу действия различают *санные, ротационные микротомы, а также криотомы.*



Как традиционно проводится микротомия в лаборатории?

Традиционно лаборанты-гистологи работают на санных микротоммах МС-2



Как традиционно проводится микротомия в лаборатории?



Для работы на санном микротоме используют МНОГОРАЗОВЫЕ микротомные ножи, которые периодически необходимо затачивать



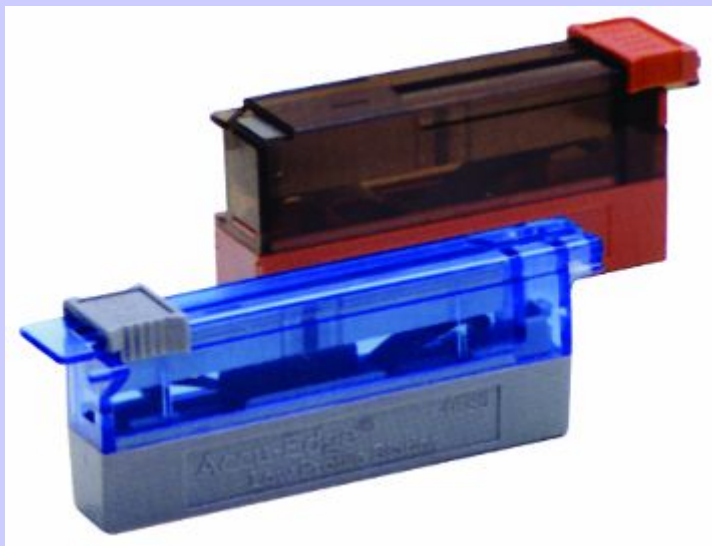
Недостатки работы на санном микротоме

1. ОЧЕНЬ трудоемкий процесс микротомирования
2. Необходимость постоянной оптимизации механизма микротоме
3. Невозможно получить серию срезов, что зачастую необходимо для анализа структуры ткани

Недостатки работы с МНОГОРАЗОВЫМИ ножами

1. Невозможно получить качественные срезы мягких тканей
2. Трудности в получении тонких (до 1 мм толщиной) срезов
3. Проблематичность организации процесса заточки ножа
4. Дороговизна абразивных материалов, необходимых для заточки
5. Необходимость закупки дополнительного оборудования для заточки ножей

Одноразовые микротомные ножи



Преимущества работы с одноразовыми микротомными ножами

1. Отсутствует необходимость постоянной заточки
2. Отсутствует необходимость закупки дорогостоящего оборудования и абразивных материалов для заточки
3. Возможность получения высококачественных тонких срезов
4. Для различных типов тканей существуют особые типы одноразовых ножей
5. Каждый нож покрыт специальным покрытием, предотвращающим его от повреждений и коррозии

Современные санные электрические микротомы



Криотомы



Окраска

Окраска препаратов позволяет оценить :

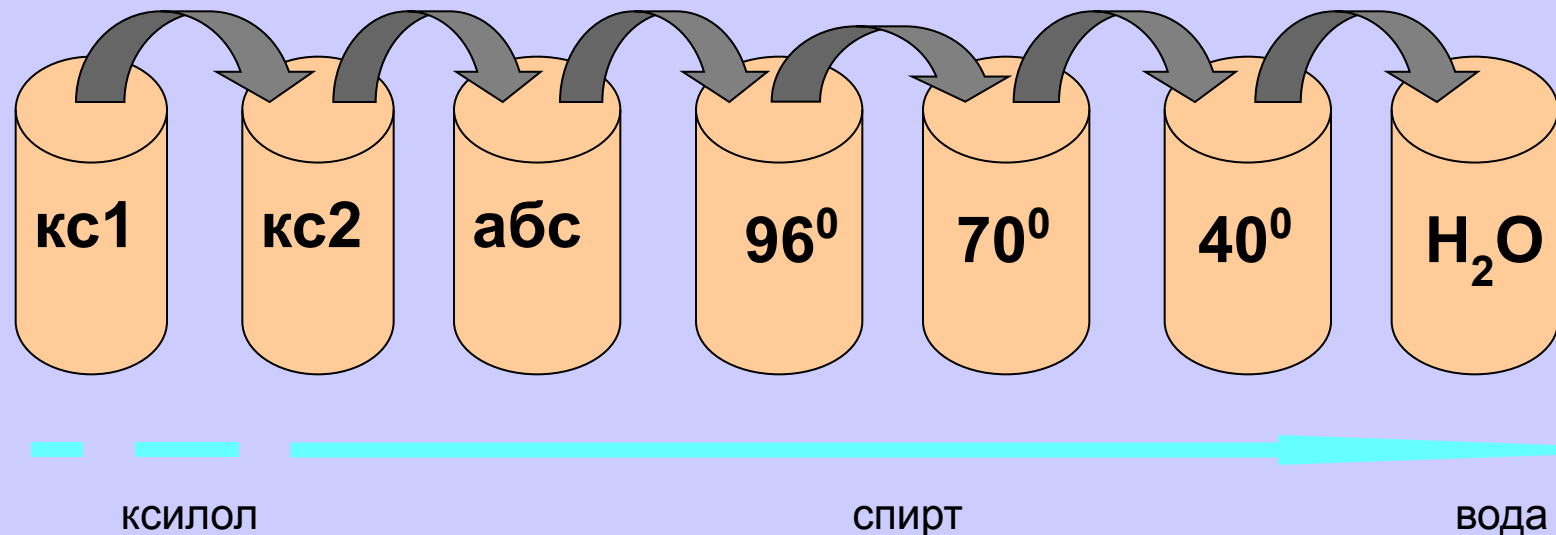
- морфологию ткани**
- наличие патологических изменений в ткани или клетке**
- наличие патогенных микроорганизмов**
- активность некоторых белков, ответственных за внутриклеточные процессы**

Подготовка препарата к окраске

- Большинство красителей не проникают в срезы, пропитанные парафином, поскольку являются водо- или спирторастворимыми веществами
- Парафин перед окраской препаратов должен быть удален
- Для этого препарат подвергается процедурам **депарафинизации и регидратации**

Депарафинизация срезов

- Препарат последовательно проводят через ксилол и батарею спиртов для удаления парафина.



Традиционно в лабораториях краски готовят из сухих веществ



Сухие красители

Недостатки:

- Огромные временные затраты на приготовление красителей
- Зависимость качества приготовленного красителя от мастерства лаборанта
- Сложности с закупками отдельных сухих красителей
- Необходимость закупать дополнительные реактивы – кислоты, щелочи, соли
- Низкий уровень стандартизации результатов

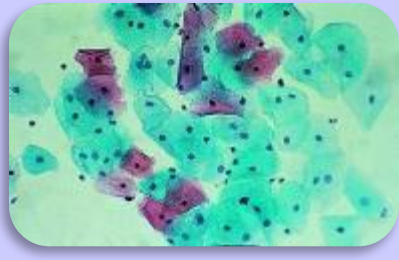
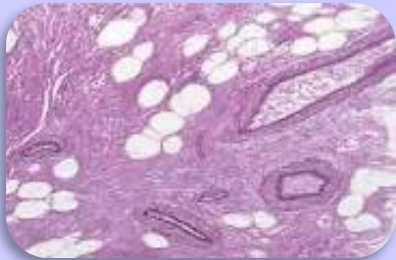
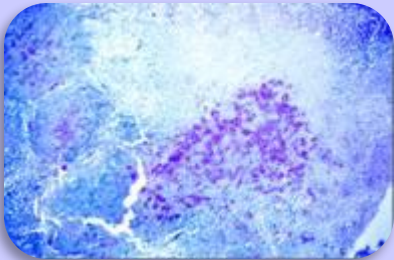
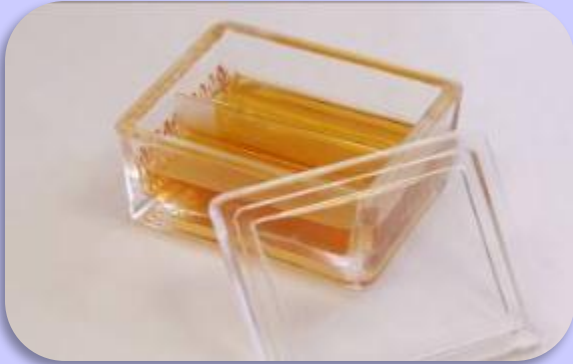
Готовые красители

Наборы красителей

Растворы красителей



ОКРАСКА



Окраска

вручную

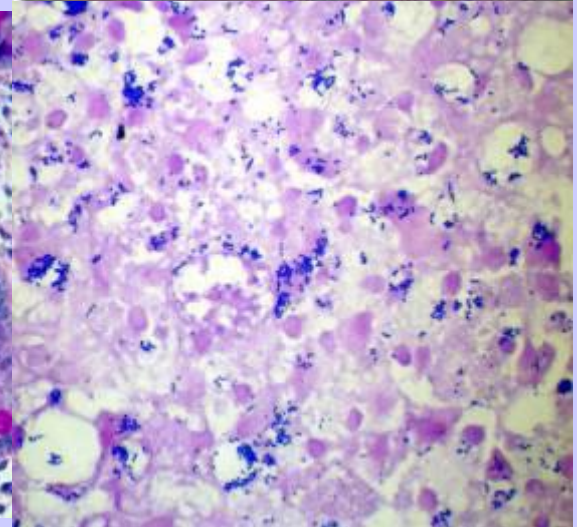
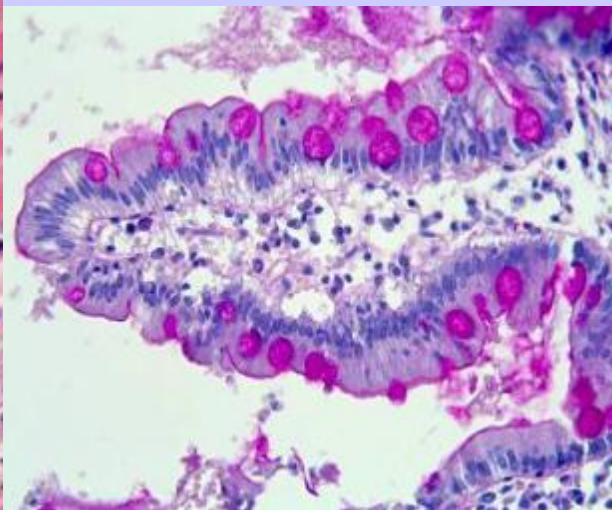
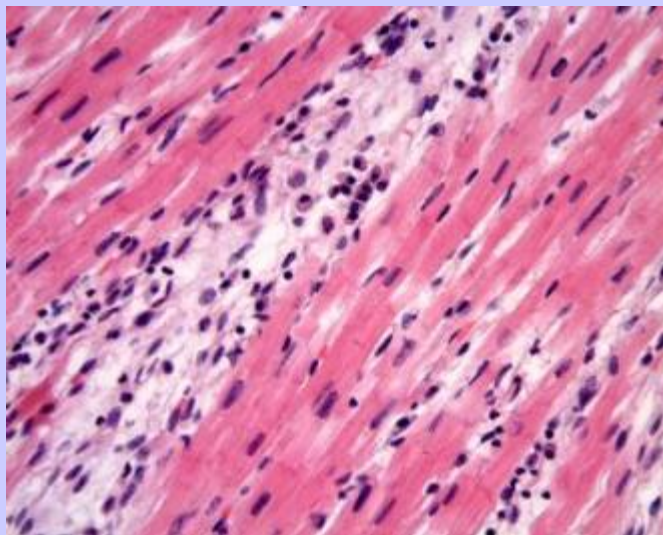
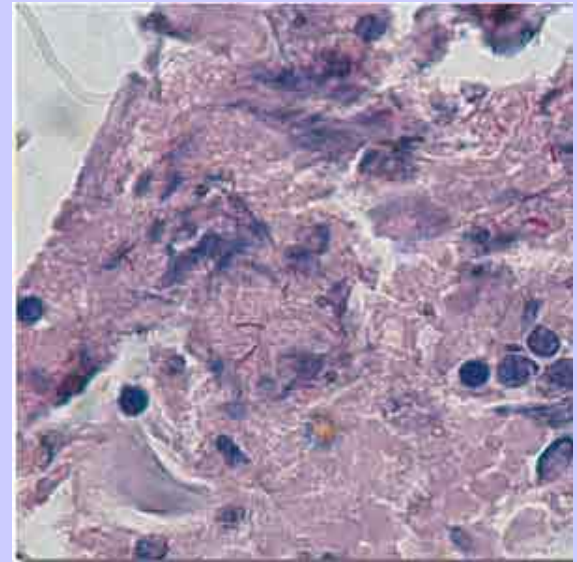


автоматическая



Основные методики окраски

Гематоксилин-Эозин
Альциановый синий рН 2,5
Окраска по Граму
Окраска по Цилю Нильсену
Окраска по Павловскому
ШИК-реакция
Азур-эозин по Романовскому
Май Грюнвальд



Заклучение препаратов

Заклучение препаратов – этап подготовки препарата к последующему архивированию.

Препарат закрывают под покровное стекло с помощью прозрачные сред, которые предохраняют его от воздействия влажности, УФ лучей и других факторов, влияющих на качество препарата в процессе архивирования.



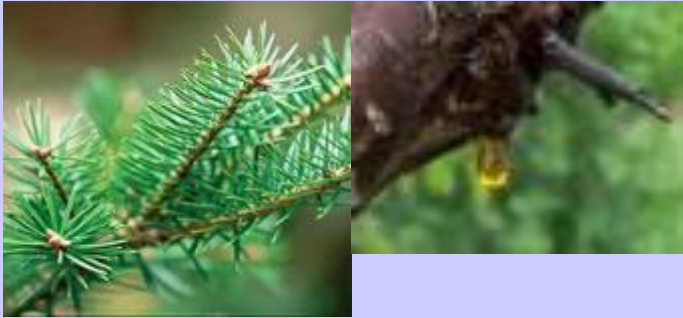
Заклучение препарата = Сохранение препарата

Среды для заключения

Традиционные среды

Канадский бальзам

- Очень долго сохнет (до трех дней)
- Дорогой (1 л стоит 120 EUR)



Полистирол

- Необходимо готовить
- При архивировании белеет и трескается
- ТОКСИЧЕН!



Готовые среды

Био маунт

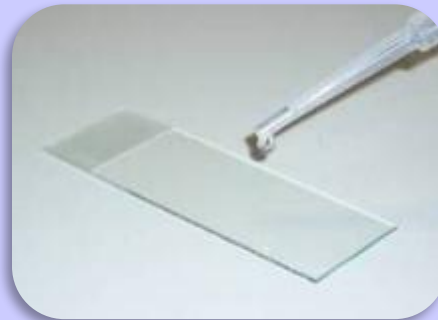
Hi Mo, Маунт квик

Tissue-Mount



ЗаклЮчение препаратов

Вручную



Автоматическое

- **Заклучение под стекло**
- **Заклучение под пленку**





*Аппарат
Tissue-Tek
Prisma для
закл*

ючения

*Аппарат Tissue-Tek Film для
окрашивания*

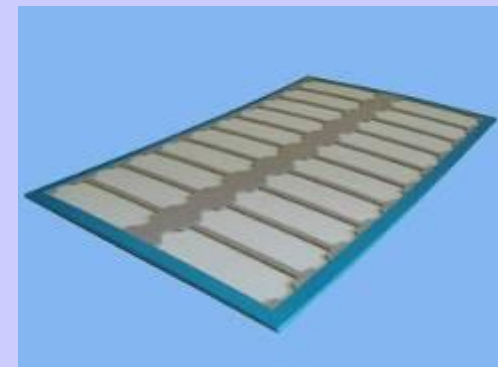
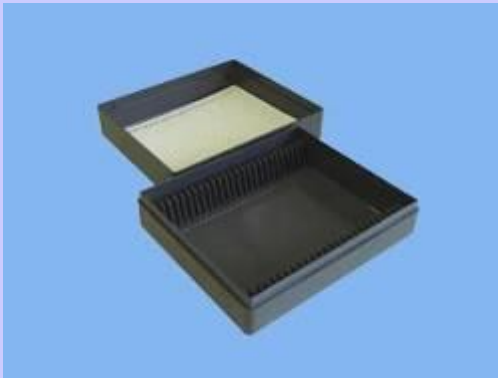
МИКРОСКОПИЯ



Архивирование

Архивирование препаратов предполагает их длительное хранение в специально отведенных помещениях (архивах)

Препарат может быть востребован как в течение первых двух лет, так и через 15 лет после проведения гистологического исследования.



Система влажного архива



Биоматериал, который необходимо сохранить помещают в полиэтиленовый рукав, заливают формалином, запаивают на специальном устройстве для запайки. Затем маркируют и помещают в шкаф.

A high-magnification light micrograph of adipose tissue. The image shows numerous large, pale, circular adipocytes with thin, dark borders, arranged in a honeycomb pattern. The cytoplasm and nuclei are compressed to the periphery of the cells. The background is a dense, reddish-pink matrix of connective tissue.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

