

ЗАНЯТИЕ 14

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологическое исследование – это морфологическое исследование тканей, органов больного человека включает биопсию и исследование операционного материала.

Биопсия – это морфологическое исследование кусочков ткани, взятых от больного *с диагностической целью*.

Исследование операционного материала – это морфологическое исследование тканей, органов, удаленных у больного при хирургической операции, проводимой *с лечебной целью*.

Гистологическое или патоморфологическое исследование является самым важным в диагностике злокачественных опухолей, одним из методов оценки лекарственного воздействия.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ

ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

- ❖ Световая микроскопия.
- ❖ Фазово-контрастная микроскопия— метод получения изображений в оптических микроскопах, при котором сдвиг фаз электромагнитной волны трансформируется в контраст интенсивности.
- ❖ Темнопольная микроскопия.
- ❖ Интерференционная микроскопия.
- ❖ Поляризационная микроскопия.

- ❖ Люминисцентная (флуоресцентная) микроскопия.
- ❖ Ультрафиолетовая микроскопия.
- ❖ Электронная микроскопия.
- ❖ Цитоспектрофотометрия.
- ❖ Радиоавтография.
- ❖ Иммуноцитохимические методы.
- ❖ Метод культуры клеток.
- ❖ Микроскопическая хирургия клетки.

Иммуногистохимическое исследование — метод микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое выявление в них искомым веществ и основанный на обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу, которое в данной ситуации служит антигеном. Впервые способ окрашивания клеточных и тканевых компонентов с помощью специфических антител для микроскопического исследования был предложен А. Coons с соавт. в 1941 году; позднее были разработаны антитела, меченные не флуоресцентными красителями, а

Прямой иммуногистохимический метод основан на реакции специфического связывания маркированных антител непосредственно с выявляемым веществом.



Непрямой иммуногистохимический метод является более чувствительным, основан на том, что немаркированные первичные антитела связываются с искомым антигеном (выявляемым веществом), а далее уже их выявляют при помощи вторичных меченых антител, при этом первичные антитела служат для вторичных антигенами.

Приготовление гистологического препарата:

1) **Фиксация** — фрагмент ткани обрабатывают с помощью жидкости-фиксатора, в роли которого чаще всего выступает формалин, реже — спирты, пикриновая кислота и др. Это предотвращает распад клеток и разрушение структуры ткани под действием собственных ферментов клеток и процессов гниения, таким образом сохраняя прижизненную структуру и делая возможным изучение ткани. Принцип действия фиксирующих жидкостей основан на быстрой гибели клеток и коагуляции белка. Наиболее распространенный тип фиксации — **иммерсионная фиксация**, при которой фрагмент ткани целиком погружается в раствор; в экспериментальных условиях также используют **перфузионную фиксацию**, при которой фиксатор вводят через сосудистую систему.

2) **Проводка** — процесс обезвоживания фрагмента ткани и пропитки его парафином. Этот этап обеспечивает уплотнение ткани, которое, в свою очередь, необходимо для получения срезов (если ткань будет излишне мягкой, то при микротравмировании она будет «сминаться», образуя складки, разрывы и другие артефакты, делающие её непригодной к изучению). Традиционно проводку осуществляли путем последовательного погружения ткани в растворы **ксилола** и **этилового спирта**, однако в виду трудоемкости, длительности, токсичности, а также нестабильного качества получаемой ткани, для проводки лаборатории используют **изопропанол**, являющийся нетоксичным, а также аппараты — гистопроцессоры, имеющие закрытый контур и таким образом не допускающие испарений в воздух лаборатории.

3) **Заливка** — процесс создания блока, достаточно твердого, чтобы быть пригодным для резки (микротомирования). Выполняется путем заливания фрагмента ткани жидким парафином, целлоидином, пластмассой или специальными средами для заливки. Затем залитую ткань остужают до затвердевания блока. Чаще всего для изготовления блоков пользуются специальными заливочными средами, представляющими собой смесь парафинов с присадками. Эти присадки придают парафину эластичность, что не дает ему крошиться при резке.



4) **Резка**, или микромирование, представляет собой изготовление тонких срезов на специальном приборе — микротоме. Толщина срезов, предназначенных для световой микроскопии, не должна превышать 4 — 5 мкм, для электронной — 50 — 60 нм.

5) **Окрашивание** срезов позволяет выявить структуру ткани за счет неодинакового химического сродства различных элементов ткани к гистологическим красителям. Во избежание формирования складок срез после микромирования помещают на поверхность подогретой воды, где он расправляется, а потом уже на стекло. Окрашивание, как и все остальные стадии процесса изготовления гистологического препарата, может выполняться вручную и автоматически. Различают традиционное окрашивание и иммунохимическое.

6) **Заклучение** срезов представляет собой помещение окрашенного среза, монтированного на предметном стекле, под покровное стекло с использованием среды для заключения, имеющий коэффициент преломления, близкий к таковому у стекла — канадский бальзам, полистирол, специальные среды для заключения. Заключенный препарат можно хранить достаточно длительное количество времени, если в полистирол добавить пластификатор например дибутилфталат, срок годности гистопрепарата увеличивается до 10 лет даже без покровного стекла, в течение 3 лет изменений практически не происходит).

Для качественного исследования необходимо правильно оформлять направление на гистологическое исследование:

1)заполнять все указанные в направлении пункты с точным указанием места локализации взятого материала, его связь с окружающими тканями, обязательно указывать основные клинические проявления и давность процесса;

2)иссечение кусочков из органов для диагностической биопсии следует проводить исключительно острым инструментом, избегать сжатия пинцетом или зажимом с целью предупреждения разминания и деформации тканей. Не рекомендуется получение биопсийного материала электроинструментами, так как происходит деформация гистологических тканей и диагноз возможно поставить только в предположительной форме;

3) объект, взятый для гистологического исследования, помещают в заранее подготовленную ёмкость с фиксирующей жидкостью 10% формалин; 10% формалин наливают в чистую посуду, так, чтобы формалина было не менее чем в 10 раз больше объёма фиксируемого объекта, после чего посуду закрывают герметической крышкой или пробкой. Нельзя применять формалин более высокой концентрации или формалин с вышедшим сроком годности - с белым осадком, нельзя помещать мелкий диагностический материал в посуду из тёмного малопрозрачного стекла с узким горлышком;

4) в случаях, когда диагностический материал содержит примесь большого количества крови (соскобы со слизистых оболочек женских половых органов), следует, до помещения в фиксирующую жидкость, освободиться от крови, путём промывки соскобов в ванночке с теплым физиологическим раствором, поместив их в марлевый мешочек, либо промыть тёплой водой под краном, а затем, промокнув излишки промывной жидкости, поместить в фиксатор. При этом соскоб не должен содержать кровь, которая пагубно влияет на обработку материала, уменьшает количество представительного диагностического материала и снижает полноценность гистологического исследования;

5) посуда с диагностическим или операционным материалом обязательно маркируется: пишется фамилия, инициалы и возраст пациента, присваивается номер. Маркировка не должна проводиться на крышке, закрывающей посуду;

6) фрагменты ткани или органа, полученные при биопсии с диагностической целью, запрещается делить на части и посылать в разные патологоанатомические лаборатории;

7) материал для патогистологического исследования должен быть достаточно представительным, а кусочки, после специальной обработки и окраски, сохранять информацию для диагноза или диагностического описания;

8) материал в виде слизи, экссудата или крови, а также очень мелкий материал (менее 1 мм) не считается полноценным объектом гистологического исследования.