

КОЗІЙ М.С., САМОЙЛЮК В.В.

**ГІСТОЛОГІЧНА
ТА ЕМБРІОЛОГІЧНА
ТЕХНІКА**

монографія

**Дніпро
Журфонд
2025**

УДК 576.3.59.8:612.014.1

K59

Друкується за рішенням Вченої ради Дніпровського державного аграрно-економічного університету (протокол № 2 від 31.10.2024 р.)

Рецензенти: Провідний науковий співробітник лабораторії біотехнології Інституту рибного господарства Національної академії аграрних наук України, доктор біологічних наук, професор Бучацький Л.П. Доктор біологічних наук, професор кафедри біології, професор кафедри біологічних основ фізичного виховання, здоров'я і спорту Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченко Жиденко А.О.

Професор кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології, доктор ветеринарних наук, професор Склярів П.М.

Козій М.С., Самойлюк В.В.

K59 Гістологічна та ембріологічна техніка: Монографія. /Наукове видання/ – Дніпро, Журфонд, 2025. – 212 с.

Наводяться результати експериментальних досліджень, дається об'єктивна оцінка існуючим та інноваційним методам гістологічної та ембріологічної техніки органів та тканин людини.

Значну увагу приділено теоретичним принципам препарування, заливання, мікротомування та отримання постійних гістологічних та ембріологічних препаратів.

Запропоновано нові методи ацетонового зневоднення, комбінованої (пара-фін-целюдиної) заливки, мікротомування, прогресивного фарбування, освітлення та укладання м'яких тканин, а також декальцинації та отримання мікрошліфів кісткового матеріалу.

ISBN 978-966-934-680-3

© Козій М.С., 2025

© Самойлюк В.В., 2025

© Журфонд, 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Розділ I. ГІСТОЛОГІЧНА ТА ЕМБРІОЛОГІЧНА	
ТЕХНІКА.....	6
1.1 Відбір матеріалу.....	6
1.2 Фіксація.....	10
1.3 Промивка.....	25
1.4 Зневоднення (дегідратація) матеріалу.....	29
1.5 Обробка матеріалу в інтермедіаторі.....	34
1.5.1 Ацетон та діетилендіоксид, як альтернативні інтермедіатори.....	36
1.6 Заливання в парафін (парафін-целоїдин).....	38
1.6.1 Термостат для заливання гістологічних об'єктів у парафін (парафін-целоїдин).....	52
1.7 Модифікація методики ацетонового зневоднення.....	58
1.8 Модифікація методики комбінованого (парафін-целоїдинового) заливання.....	62
1.9 Збереження гістологічних об'єктів.....	71
1.10 Формування парафінових (парафін-целоїдинових) блоків.....	76
1.11 Приготування зрізів.....	84
1.11.1 Характеристика мікротомів: можливі шляхи удосконалення.....	84
1.11.2 Вибір мікротомного ножа.....	92
1.11.3 Точка та правка мікротомних ножів.....	93
1.11.4 Нахил мікротомного ножа та вибір кута різання.....	94
1.11.5 Техніка приготування парафінових (парафін-целоїдинових) зрізів.....	95
1.11.6 Нові принципи роботи мікротомів: шляхи пошуку та альтернативні рішення.....	98
1.11.7 Вибір та підготовка предметного скла.....	117
1.11.8 Розправлення зрізів.....	118

1.11.9 Наклеювання зрізів.....	121
1.11.10 Просушування зрізів.....	125
1.11.11 Підготовка зрізів до фарбування.....	126
1.11.12 Фарбування зрізів.....	134
1.11.13 Освітлення та укладання зрізів.....	146
1.12 Декальцинація кісткового матеріалу.....	154
1.13 Підготовка мікрошліфів кісток.....	156
Розділ II. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	159
2.1 Особливості гістологічної техніки нервової системи.....	159
2.2 Особливості гістологічної техніки крові та органів кровоносної системи	162
2.3 Особливості гістологічної техніки дихальної системи	168
2.4 Особливості гістологічної техніки травної системи	174
2.5 Особливості гістологічної техніки кістково-м'язової системи	183
2.6 Особливості гістологічної техніки сечостатевої системи	186
2.7 Особливості гістологічної техніки ендокринної системи та провізорних органів.....	192
2.8 Особливості гістологічної техніки шкіри та її похідних.....	196
ВИСНОВКИ.....	198
НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	200
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	202
ДОДАТОК.....	207

ВСТУП

Завданням гістологічної техніки є підготовка досліджуваного матеріалу для спостереження, так як у більшості випадків він за своєю формою та оптичними властивостями є непридатним для дослідження. При підборі мікротехнічних методик необхідно підходити до них дуже критично: потрібно уникати випадковостей, і, послідовно групуючи, підбирати окремі методи згідно кінцевої мети. При звичайних дослідженнях цілком достатнім є застосування найдоступніших методів фіксації та заливання. Проте, при цьому помилково було б вважати, що ці методи однаково придатні для будь-яких цілей. Думки гістологів щодо придатності того чи іншого способу обробки до окремих об'єктів можуть значною мірою відрізнятися. Таким чином, відсутність уніфікованої методики, яка застосовується однаково до всіх типів тканин, передбачає постійний пошук і впровадження в гістологічну практику альтернативних та перспективних прийомів. Останнім часом мікроскопічна техніка збагатилася багатьма досягненнями. Основною її особливістю є наявність незліченної кількості оригінальних підходів, або «секретів робочого столу», незнання яких ускладнює роботу гістолога або взагалі робить її безуспішною.

Результати, отримані нами в ході численних експериментів, часто не узгоджуються з результатами, отриманими іншими дослідниками, а розроблені та випробувані прийоми відрізняються від методик, викладених у багатьох довідкових посібниках. Ми вважаємо, що в результаті введення у гістологічну практику деяких модифікацій відомі методики стають найбільш конкретними, а результати – достовірними.

РОЗДІЛ 1

ГІСТОЛОГІЧНА ТЕХНІКА

1.1 Відбір матеріалу

Успіх гістологічної обробки тканин ембріонів суттєво залежить від якості вихідного матеріалу. Найкращого результату можна досягти у тому випадку, коли відбір проводиться безпосередньо з щойно отриманого матеріалу. Іноді виникає необхідність дослідження тканин, відібраних з трупного матеріалу. Це часто буває у тих випадках, коли швидка доставка об'єкту у гістологічну лабораторію з будь-яких причин неможлива (Bögréné V., Bodrogi G., Kis A. [15]).

Правила відбору та підготовки матеріалу до проведення мікроскопії досить різноманітні, а техніка потребує певних умінь та навичок (Корас М.І. [40]). Так, для гістологічних досліджень найбільше підходять ембріони раннього гестаційного віку, Enesco M., Leblond C. [24] та G. Kiszely [39] вважають, що їх можна фіксувати повністю. Але наші спостереження показують, що перед зануренням у фіксатор об'єкти таких розмірів все ж таки необхідно розрізати на три рівні частини: цей нескладний прийом забезпечить кращу якість фіксації.

Препарування тіла ембріону, насамперед, має проводитися з урахуванням анатомо-морфологічних особливостей. У зв'язку з цим, слід володіти необхідними знаннями стосовно топографії внутрішніх органів (рис. 1.1.1).



Рис. 1.1.1 – Розтин плоду людини

Розтин виконується в наступній послідовності:

- у районі лобка ножицями (загальнохірургічними або очними) зробити невеликий надріз;
- ввести в цей надріз дужку ножиць і, не заглиблюючи її в черевну порожнину, розрізати об'єкт в напрямку голови;
- вирізати ножицями бічну стінку тулуба, оголивши внутрішні органи;
- перерізати ножицями або лезом безпечної бритви стравохід та пряму кишку, обережно розрізаючи фасції, видалити внутрішні органи з тіла.
- препарування голови виконується у наступній послідовності.
- лезом безпечної бритви вирізати фрагменти глотки, язика, губи, щоки;
- скальпелем розрізати очний нерв, видалити око;
- скальпелем відсікти задню частину потиличної кістки черепа;
- акуратно видалити скальпелем тім'яну кістку черепа;
- дуже обережно перерізати скальпелем частки переднього мозку та кінцевий відділ довгастого мозку;
- гістологічним шпателем підчепити головний мозок знизу і, намагаючись не пошкодити мозкові оболонки, орган видалити.

Після завершення розтину голови та черевної порожнини, негайно приступають до препарування кожної системи органів окремо.

НЕРВОВА СИСТЕМА: головний мозок ембріонів фрагментують лише у тому випадку, якщо він досить великий (близько 2,5-3,5 см), у разі меншої довжини його поміщають у фіксатор повністю. Слід зазначити, що в процесі препарування не завжди вдається виділити гіпофіз та його придатки.

Спинний мозок вилучають таким чином: біля основи черепа слід обережно надламати хребетний стовп, в цей час на місці зламу оголиться спинномозковий тяж. Фрагмент спинного мозку легко видаляється зі спинномозкового каналу – при цьому неминуче відбувається пошкодження структури нервових корінців. Препарування спинальних гангліїв практично неможливе: доцільним є виконання серійних зрізів тулуба. Нерви, а також

нервові закінчення препаруються одночасно, разом із прилеглими ділянками тканин.

СЕНСОРНІ ОРГАНИ: очі фіксуються повністю, але, з метою кращого проникнення фіксатора, обережно роблять невеликий надріз збоку (в цей час категорично неприпустиме зминання органу). Препарування задньої стінки ока не рекомендується, тому що будь-який дотик до сітківки неминуче її ушкоджує.

Органи нюху, слуху та рівноваги препарувати також не рекомендується: доцільним є виконання поперечних або поздовжніх серійних зрізів голови.

КРОВ І КРОВОНОСНА СИСТЕМА: забір крові проводиться зі шлуночка серця за допомогою одноразового шприца. Мазки крові необхідно виконати якомога швидше, тому що кров майже миттєво згортається. Виконання мазка виконується в такий спосіб (рис. 1.1.2).

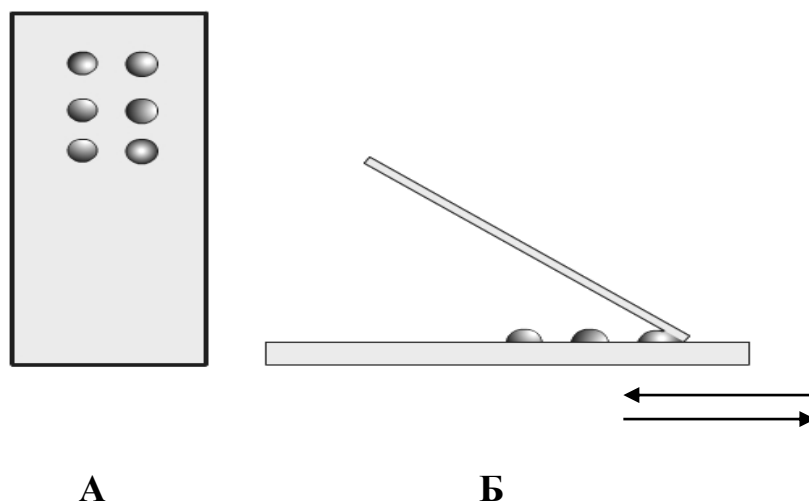


Рис. 1.1.2 – Послідовність виконання мазка крові
А – нанесення кількох крапель крові на предметне скло;
Б – розтирання крапель крові за допомогою предметного скла

Нанесення на предметне скло кількох (звичайно п'яти-шести) невеликих крапель крові обумовлено рівномірністю їх з'єднання та розтікання по ньому під час подальшого розтирання; якість мазка, виконаного з однієї великої краплі, часто буває незадовільною.

Після того, як мазок виконаний, його сушать при кімнатній температурі: добре висушений мазок має однорідну матову поверхню. Пересушування категорично є неприпустимим, тому що під час тривалого контакту з повітрям деякі формені елементи крові руйнуються. У зв'язку з цим, мазок необхідно якомога швидше зафіксувати.

Зберігання крові, навіть короткочасне, за допомогою антикоагулянтів є неефективним: навіть дуже якісні мазки, виконані з гепаринової або цитратної крові, відповідно зафіксовані та зафарбовані, не відображають всієї повноти гематологічної картини.

Серце необхідно висікати повністю, а також з невеликими ділянками прилеглих до нього кровоносних судин. Розкривати серцеві камери додатково не рекомендується.

Тимус і селезінка вирізаються повністю (під час видалення селезінки необхідно стежити за цілісністю прилеглих ділянок травного тракту).

СИСТЕМА ОРГАНІВ ДИХАННЯ: якщо легені належать невеликому ембріону, то їх не відокремлюють: всі висікаються разом; якщо легені великих розмірів – доцільно відокремлювати окремо кожний орган.

СИСТЕМА ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ: категорично не рекомендується препарування фасцій ділянок травного тракту, тому що в цей час можливе не тільки пошкодження оболонок кишкової трубки, а і близько розташованих до них паренхіматозних органів. Для найкращого проникнення фіксатора, вирізані ділянки кишечника не повинні перевищувати довжину 1,0 см. Розрізати по довжині кишкову трубку не рекомендується, тому що у процесі фіксації вона суттєво деформується.

Травні залози (печінка з жовчним міхуром і підшлункова залоза) вирізати окремо також недоцільно, тому що в цей час можна легко пошкодити прилеглі ділянки травного тракту.

Висікання плавального міхура допускається як повністю, так і фрагментами.

ШКІРА ТА ЇЇ ПОХІДНІ: зразки переважно відбирають з ділянок дорсальної або латеральної частини тулуба, в цей час заглиблюються у м'язову тканину на 2,0-3,0 мм.

ОПОРНО-РУХОВА СИСТЕМА: фрагменти хрящової або кісткової тканини висікаються невеликим ретрактором або просто скальпелем разом з прилеглими ділянками тканин. Скелетна м'язова тканина вирізається скальпелем або лезом безпечної бритви, переважно в ділянці кінцівок.

СЕЧОСТАТЕНА СИСТЕМА: нирки дуже обережно відшаровуються від внутрішньої поверхні тулуба за допомогою гістологічного шпателя або очного скальпеля. Сечовий міхур і гонади препаруються повністю, разом із ділянкою ануса або фрагментами.

1.2 Фіксація

Фіксація тканин є першим і найголовнішим кроком у мікротехнічному комплексі. Мета цієї процедури полягає у збереженні об'єкта у такому вигляді, в якому він існує у живому стані (Futaersaru Y. [29], Gerch I. [30], Leblond C.P. [43], Mc Clung C.E. [46], Needman J. [50], Parker P.C. [51], Roulet G. [54]) і, у зв'язку з цим, позитивний результат гістологічного дослідження в першу чергу залежить від того, наскільки надійно і повністю в клітинах і тканинах збережені структури, що вивчаються (Aherne G. [11], Bensley R.R., Bensley S.A. [14], Chillaber C.R. [20], Hammar F. [35], Sabatini D.D. et al. [55], Uolita M., Kannas O. [63]).

Найбільш суттєві труднощі, які найчастіше виникають перед гістологами, пов'язані з недостатньою збереженістю матеріалу (Cameron G. [17], Elledor M. [23], Engstrom A. [25]). На це збереження можуть вплинути деякі фактори і технологічні помилки, з яких слід згадати занадто пізню фіксацію; посмертні зміни; підсихання тканин; недостатню кількість фіксуючої рідини та погане її проникнення у тканини; фіксацію рідинами, що непридатні для досліджуваного матеріалу тощо.

За можливістю, фіксацію бажано проводити відразу після взяття матеріалу. Розтин та препарування необхідно здійснювати якомога швидше; якщо це неможливо, матеріал слід помістити в холодильну камеру або на лід. Зокрема, є можливість використання морозильних камер побутових холодильників для тимчасового зберігання зразків тканини. Наші спостереження показують, що слід уникати повільного заморожування нефіксованої тканини при температурах, близьких до 0°C, оскільки утворюються великі кристали льоду, що призводять до появи артефактів. Повторне заморожування та розморожування руйнують тканинні структури, вивільняють ферменти і викликають дифузію розчинних компонентів клітини (рис. 1.2.1).

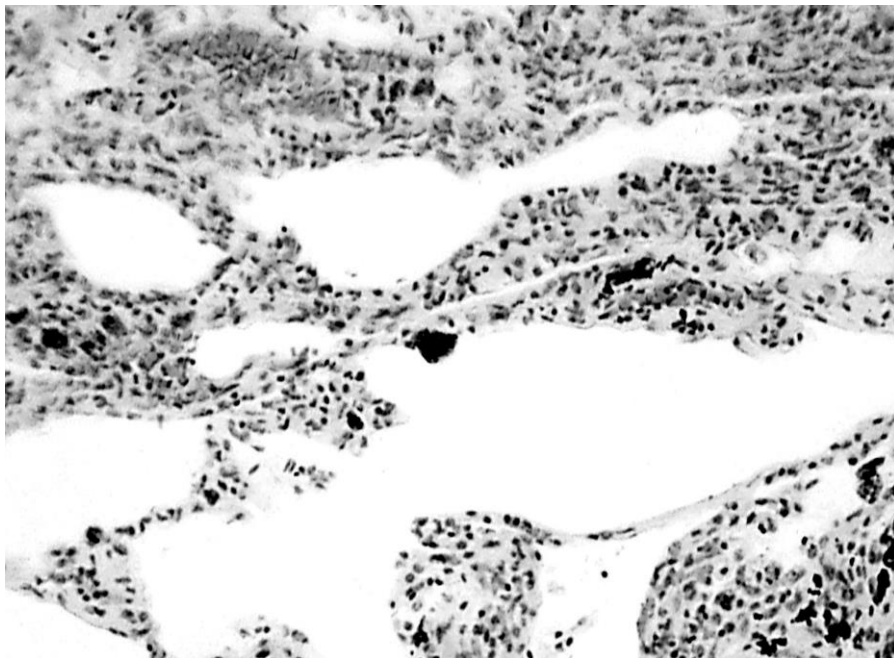


Рис. 1.2.1 – Руйнування структури паренхіми селезінки в результаті повільного заморожування. Реактив Цинзерлінга, 400х

Якщо тканину до закінчення розтину залишити нефіксованою, то відбувається зневоднення поверхневих шарів клітин, що призводить до порушення їхньої структури; якщо ж їх помістити у фізіологічний розчин, то вже при кімнатній температурі через 3-4 хвилини починається посилений автоліз. Таким чином, для гістологічних досліджень швидке препарування внутрішніх органів та їх наступна фіксація є кращими, ніж їх зберігання на льоду.

Розрізняють фізичні та хімічні методи фіксації. До перших відносяться термічна фіксація та ліофільне висушування (глибоке заморожування матеріалу з подальшим вакуумуванням). Якщо метод фіксації в бані, що кипить застосовується порівняно мало, то ліофільне висушування має багато переваг над усіма відомими методами фіксації. Тканина в цей час не зморщується, фіксація перебігає в ній рівномірно усіма напрямками, розчинні речовини не екстрагуються, хімічний склад тканини практично залишається незмінним, і, нарешті, її структура, як правило, зберігається – можливі лише незначні ушкодження, що викликаються утворенням крижаних кристалів. Крім цього, фіксація відбувається настільки швидко, що функціональні процеси у клітині можуть зупинитися у найкритичніший момент.

Можна вважати, що метод ліофілізації дає можливість спостерігати тканину в проміжному стані між живим і фіксованим. Цей спосіб досить дорогий і через це рідко застосовується. У гістологічній практиці найчастіше використовується хімічна фіксація матеріалу. Для більш повного збереження прижиттєвих структур клітин та тканин застосовують спрямовані фіксатори. Вони поділяються на три основні групи: 1 – ядерні фіксатори (спирти, формальдегід, безводний ацетон), формалінові суміші (фіксатори Шабадаша, Шафера та ін.), пікринові фіксатори (суміші Буена, Ружа та ін.); 2 – для фіксації цитоплазми (фіксатор Флемінга, фіксатор Германа та ін.); 3 – фіксації мітохондрій (фіксатор Левитського та ін.). Під час ембріологічних досліджень найчастіше користуються лише ядерними фіксаторами.

Слід пам'ятати, що під час занурення шматочка тканини у фіксуючу рідину клітини не гинуть миттєво і можуть відбутися так звані «посмертні» зміни, обумовлені станом аноксії, зміною концентрації водневих іонів або дією ферментів (автоліз). Фіксатор проникає в тканини шляхом дифузії так, що клітини, розташовані на поверхні, фіксуються швидше і повніше, ніж у глибині. Тому в кожній тканині існує градієнт фіксації, який залежить від її проникності для даного фіксатора та поступового розведення останнього тканинною рідиною. Можливо швидкість проникнення фіксатора визначається не скільки

коефіцієнтом дифузії, скільки утворенням бар'єру з осадженого білка на периферії тканини. Крім цього, в матеріалі, що фіксується внаслідок екстракції розчинних речовин (електролітів, вуглеводів, деяких ліпідів) можуть виникати додаткові дифузійні струми, що значно перешкоджають проникненню фіксатора у тканину.

Будь-яка фіксація викликає більш менш виражені зміни як структури, так і обсягу досліджуваного матеріалу (Futaesaru Y. [29], Hopwood I.A. [36], Sabatini D.D. et al. [55], Gerch I. [30]). Під час виконання фіксації тканин необхідно дотримуватись наступних правил:

А. Правильно вибрати фіксатор та його концентрацію. У гістології як фіксуючий агент найчастіше застосовують формалін; його використовують як у чистому вигляді, так і вводять у складі багатьох фіксуючих сумішей.

Формалін (НСОН) є універсальним фіксуючим засобом. Фіксація цим реактивом – фізико-хімічний процес, який проходить у кілька стадій: стадії адсорбції поверхнею матеріалу молекул формальдегіду; стадій набухання та вторинного стискання. Фіксуюча дія формаліну, перш за все, полягає в тому, що багато функціональних білкових груп зв'язуються з ним зворотно, тобто можливе їх відновлення під час промивання водою.

Деякі автори (Sabatini D.D. et al. [55]), рекомендують використовувати 20-40% розчин нейтрального формальдегіду, проте Gerch I. [30] пропонує утриматися від використання занадто концентрованих розчинів фіксатора, так як внаслідок тривалого впливу на матеріал вони викликають значне його ущільнення та стискання (іноді до 20-25% від початкового об'єму). Наші спостереження показують, що в концентрованих розчинах фіксатора багаті на воду тканини також сильно стискаються – до 30-40% і більше від початкового об'єму (Козій М.С. [2, 4, 5, 7, 8]).

На практиці звичайно використовують 10% розчин нейтрального формаліну. Проте, навіть такий ступінь його розведення не усуває проблему

стиснення клітин та тканин. Мінімальна (до 1-2%) деформація матеріалу спостерігалася під час використання 4-5% розчину фіксатора.

Відзначено, що під час тривалого зберігання у формаліні тканин, багатих на кровоносні судини, з'являються коричневі зерна так званого «формалінового пігменту», що має схожість із включеннями меланіну та суттєво утруднює проведення дослідження (рис. 1.2.2).

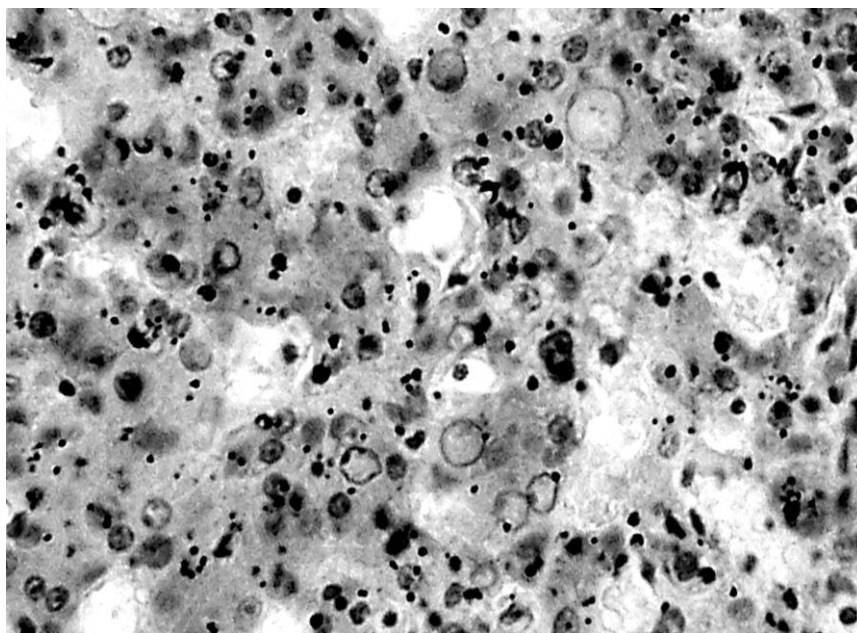


Рис. 1.2.2 – Формаліновий пігмент у гепатоцитах. Гематоксилін Ерліха, еозин, 800х

Іншим недоліком фіксатора є здатність формальдегіду до полімеризації та випадання зі своїх міцних розчинів, що веде до утворення рясних осадів (утворюються полімери групи параформальдегідів загальної формули $[(CH_2O)_n]$). Осади утворюються під час зберігання нерозведеного формаліну у холодному приміщенні або на світлі. Завдяки полімеризації відсотковий вміст розчиненого формаліну суттєво падає. Щоб уникнути цього явища, чистий формалін рекомендується зберігати в теплому приміщенні та в судинах з коричневого скла. Насправді, у разі випадання осаду ми рекомендуємо формалін просто нагріти на вогні до температури 50-60°C; після зникнення білої каламуті та пластівців осад у розчині не з'являється протягом двох-трьох місяців.

Формалін – досить слабкий фіксуєчий агент, тому після фіксації в ньому деякі цитоплазматичні структури виявляються недостатньо ущільненими для подальшого заливання у парафін. Так, у парафінових зрізах щіткова облямівка кишкового епітелію та ендотелію мозкових шлуночків часто буває «розтріпаною», а радіальна смугастість м'язів втрачає чіткість (рис. 1.2.3, 1.2.4).

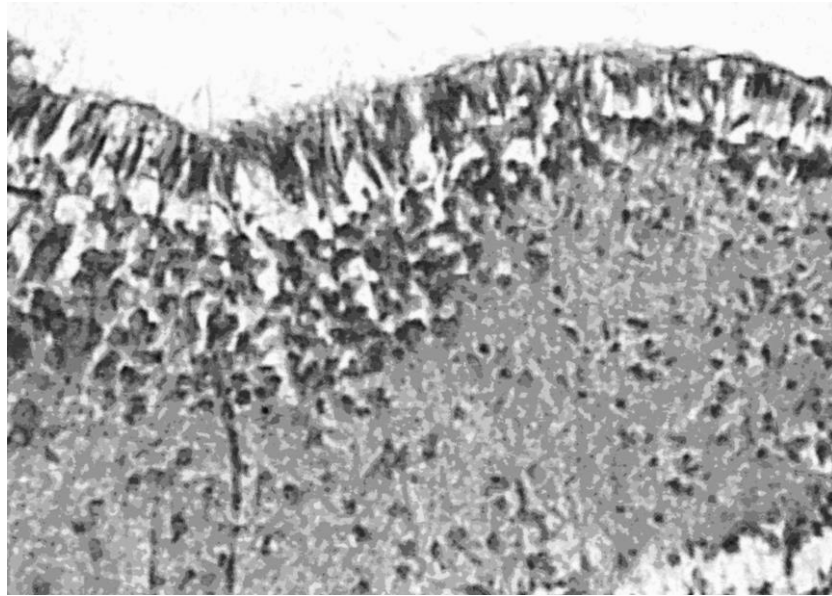


Рис. 1.2.3 – Ендотелій дна IV шлуночка довгастого мозку.

Реактив Цинзерлінга, 600 х

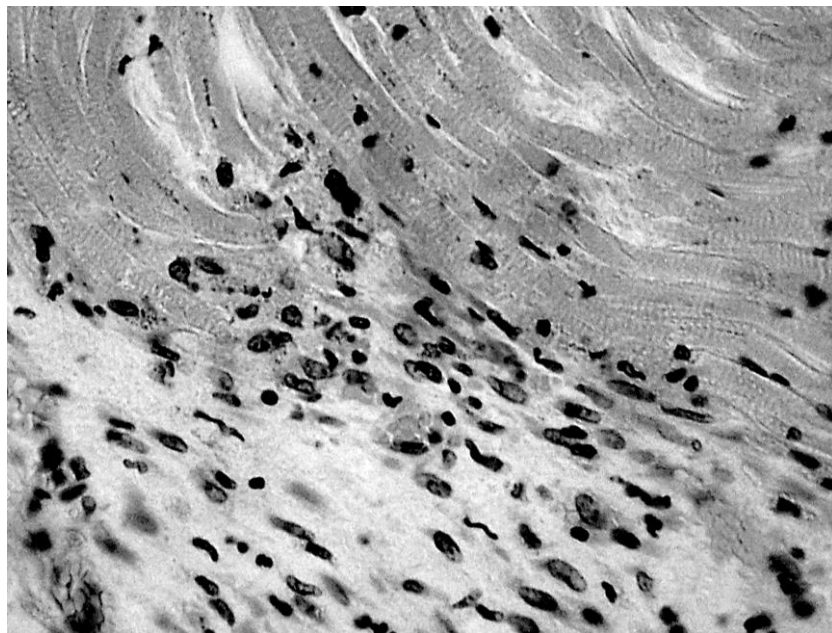


Рис. 1.2.4 – Міокард шлуночка.

Гематоксилін Ерліха, еозин, 400х

Слід пам'ятати, що існуючий зараз в продажі формалін може мати дуже кислу реакцію: тому перед застосуванням його необхідно нейтралізувати. Нейтралізація досягається настоюванням формаліну на товчній крейді протягом кількох днів з розрахунку 100,0 г крейди на 1000,0 мл нерозведеного формаліну. Так, 10% нейтральний забуферний формалін «Shandon Formal-Fixx» забезпечує непогані результати фіксації, перешкоджає надмірному ущільненню і стисканню тканин і навіть може бути використаний повторно.

Нехтування нейтралізацією суттєво відбивається на здатності тканин сприймати забарвлення, особливо під час їх тривалого зберігання у фіксаторі. Для покращення фіксації формалін можна замінити іншими реактивами або додати до нього такі речовини, як пікринову кислоту ($C_6H_2(NO_2)_3OH$) або крижану оцтову кислоту (CH_3COOH). В цей час отримують формалінові суміші або складні фіксатори. Більшість дослідників віддають перевагу рідині Карнуа. Наш досвід показує, що найкраща якість фіксації та збереження тканин гідробіонтів досягається під час використання сумішів Ружа та Буена.

Суміш Ружа вдало поєднує фіксуючі властивості формаліну та крижаної оцтової кислоти.

Склад: нерозбавлений формалін (40%) – 20 мл;
крижана оцтова кислота – 1,0 мл;
дистильована вода – 100 мл.

Крижана оцтова кислота має здатність швидко проникати у тканини і тим самим оберігає матеріал від надмірного зморщування, що є особливо важливим під час точних мікроскопічних досліджень. Задовільні результати фіксації сумішшю Ружа досягаються протягом 12-24 годин.

Суміш Буена також є ефективним фіксуючим засобом, і особливо рекомендується для обробки ембріональних тканин. Вона містить пікринову кислоту, що викликає швидку коагуляцію білків; формальдегід, який зворотно

зв'язує білкові функціональні групи і крижану оцтову кислоту, що прискорює дифузію фіксаторів.

Склад: насичений розчин пікринової кислоти (1,5-2,0%) – 15,0 мл;
нерозведений формалін (40%) – 5,0 мл;
крижана оцтова кислота – 1,0 мл.

Суміш дещо зморщує об'єкт і майже не викликає артефактів. Шматочки гістологічного матеріалу товщиною 5,0 мм, в залежності від щільності, задовільно фіксуються протягом 20-30 годин, можуть зберігатися у фіксаторі тривалий час (Burstone M.S. [16], Coons A.H. [21], Danieli I.F. [22]). Перед подальшою гістологічною обробкою необхідною умовою є промивання фіксованого матеріалу в декількох порціях 80% етанолу з метою видалення жовтої каламуті (залишків пікринової кислоти). Повне відмивання фіксатора необов'язкове, оскільки залишки пікринової кислоти остаточно відмиваються в процесі подальшої обробки.

Результати наших досліджень показують, що проникаюча здатність фіксатора Буена може бути значно покращена за рахунок змін кількісних характеристик складу суміші: формалін рекомендується використовувати розбавленим (10%, при збереженні початкового об'єму), об'єм пікринової кислоти потрібно зменшити до 7,0 мл, а крижану оцтову кислоту необхідно брати об'ємом 9,0 мл (Козій М.С. [8]). У цьому випадку «основним» фіксуєчим агентом виступає не пікринова кислота, а крижана оцтова кислота; проникаюча здатність формаліну, як відомо, збільшується зі ступенем його розбавленості. Суміш Буена, виготовлена згідно з нашою модифікацією, дозволяє досить швидко та якісно фіксувати гістологічний матеріал протягом 2-10 годин, що втричі швидше, ніж у оригіналі.

Такі фіксатори, як ацетон і спирти (зокрема, метиловий та етиловий) рекомендується застосовувати лише в окремих випадках та з певною обережністю. По-перше, усі ці фіксатори сильно вимивають жири з тканин вже

за відносно низьких температур (ацетон – при 3°C, етанол – при 11°C, метанол – при 8°C), що викликає спадання тканин (Casselman W. [18, 19]). По-друге, застосування цих фіксаторів під час обробки тканин гідробіонтів має деякі обмеження: тканини ембріонів деяких вікових категорій, після фіксації стають надмірно твердими, крихкими та деформованими, жовток сильно затвердіває і потім розпорошується (Kiszely G. [39]). Як виняток, іноді можна застосувати фіксує суміш «Shandon Reagent Alcohol», що складається з 90% абсолютного етанолу, 5% метанолу та 5% ізопропанолу. Застосування інших простих і складних фіксаторів у дослідженнях вважаємо недоцільним через недосяжність кращого результату фіксації.

Б. Встановити оптимальний час фіксації. Цей час залежить від таких факторів як тип фіксатора, інтенсивність перемішування і, особливо, від температурного режиму. Усі фіксує речовини мають оптимальний час для гістологічного об'єкту. Як правило, він тим менший, чим вища температура, і навпаки. Хоча за низьких температур процес фіксації перебігає повільніше, в цей час припиняються автолітичні процеси. Якщо фіксатор є складною сумішшю, то швидкість проникнення в тканини окремих компонентів суміші може бути різною в залежності від складу фіксатора. Так, під час фіксації сумішами оцтової кислоти з формальдегідом (суміш Ружа) та пікринової кислоти (суміш Буена), зміни у внутрішніх шарах тканини можуть бути викликані дією тільки оцтової кислоти; характер та ступінь зміни структури поверхневих шарів тканини залежать від дії інших компонентів суміші.

Після закінчення терміну дії фіксаторів, їх негативні властивості стрибкоподібно посилюються. Серед негативних властивостей на першому місці стоїть ущільнення матеріалу. Занадто ущільнений матеріал не тільки погано ріжеться, а і надмірно кривиться і деформується. Крім цього, спостерігається істотне зменшення здатності зрізів до фарбування.

На основі цитометричних досліджень об'єктивно вивчено динаміку впливу фіксує засобів на структуру тканин (Weibel K. et al. [64]). Вважається, що

поєднання вимірювання об'ємів клітин та ядер є найбільш інформативним. F. Hammar [35] зазначає, що такий підхід можливий не в всіх випадках: з одного боку, структура тканин різна, з іншого – вона додатково змінюється у процесі фіксації. Кожен фіксатор змінює стан колоїдів цитоплазми і, як наслідок, осмотичне середовище клітини. Наші дослідження підтверджують результати, отримані A. H. Coons [21]: взагалі процес фіксації призводить до помітних змін деяких структур клітин та тканин.

Показано, що під час фіксації формаліном (10% розчин фіксатора) з початку перебування об'єкта у розчині, клітини і тканини дещо набухають, а до кінця 7 діб ущільнюються і стискаються. У зв'язку з цим можна зробити висновок, що витримувати матеріал у фіксаторі понад 6-7 діб небажано, а тривале зберігання в ньому взагалі є неприпустимим. До 500-600-ї доби зберігання тканин у формаліні відбувається настільки їх сильне ущільнення і стиснення, що подальша гістологічна обробка такого матеріалу пов'язана з чималими труднощами. Ці негативні явища можливо обумовлені частковим розкладанням фіксатора. L. Spanuhof [59] вказує, що суміші Майєра, Гейденгайна, Ценкера, Буена, а також розведений (5%) розчин формаліну викликають порівняно невелику деформацію та набухання клітин та тканин. Так, реактив Буена викликає набухання та ущільнення об'єктів лише на 70-ту добу їх зберігання в суміші, що робить його застосування в гістологічній практиці найкращим.

В. Температуру процесу фіксації необхідно, наскільки це можливо, підтримувати постійною. Зазначено, що оптимальний температурний режим процесу фіксації становить близько 25°C. Коливання температурного балансу вниз уповільнює фіксацію, а вгору – прискорює її.

Деякі автори (Glick D. [31], Mc Manus J. F. A. [48], Spanuhof L. [59] та ін.) рекомендують проведення так званої прискореної фіксації: тонкі шматочки (2,0-3,0 мм) тканин розміщуються в суміші для фіксації, що майже перебуває у стані закипання. Час знаходження матеріалу у такому середовищі залежить від

його густини і становить в середньому від 0,5 до 1,5 хв. Spanuhof L. [59] фіксував невеликі зразки (товщиною 5,0-10,0 мм) шляхом кип'ятіння їх у 0,85-0,90%-му фізіологічному розчині хлористого натрію. Наші спостереження у ряді випадків підтверджують ефективність такого підходу, особливо під час фіксації тканин щільної консистенції. Примітно, що цей метод може бути корисним у тих випадках, якщо необхідно уникнути тривалого впливу на об'єкт будь-яких хімічних речовин.

Основна перевага такого підходу – швидкість. Відзначено, що слабкі розчини формальдегіду, що використовуються для термічної фіксації, достатньо зменшують розчинність і збільшують щільність тканинних білків, що є дуже корисним під час виготовлення заморожених зрізів.

Разом з тим слід зазначити, що термічна фіксація має істотний недолік: практично будь-який матеріал, фіксований таким чином, стискається і не може бути досліджений надалі цитологічними методами: висока температура може різко змінити конфігурацію клітинного ядра, а водночас і значення ядерно-цитоплазматичного відношення (константи Гертвіга). Якщо все ж таки існує необхідність здійснити фіксацію при підвищеній температурі, то це потрібно робити дуже обережно, враховуючи не тільки небезпеку передчасного зморщування тканин, але і їх розпад внаслідок теплової коагуляції (Anderson N.G. [12]). Таким чином, тривалий вплив фіксатора при підвищенні температури понад 50°C є небажаним: рекомендувати такий метод фіксації, на наш погляд, можна тільки в деяких випадках, зокрема, для отримання оглядових парафінових зрізів.

Г. Не фіксувати надто великих і надто тонких шматочків досліджуваного матеріалу. Товщина тканинних блоків повинна бути такою, щоб фіксуюча рідина легко і досить швидко проникала у них. Багато дослідників вважають за краще фіксувати шматочки, що нагадують кубик (10,0x10,0x10,0мм). Зокрема, Spanuhof L. [59] пропонує покращити фіксуючі та проникні властивості формаліну шляхом додавання до його концентрованого

розчину (100,0 мл) 8,5 г хлориду натрію (сольовий формалін). На думку автора, це сприяє рівномірній дифузії фіксатора в товщу матеріалу, так як концентрація солі створює осмотичний тиск, аналогічний прижиттєвому. Ми вважаємо, що такі параметри вирізання тканини та її подальша обробка за даним прописом не завжди сприяють якісній фіксації: визначено, що в цьому випадку добре фіксуються лише поверхневі шари шматочка, тоді як проникнення фіксатора в його середину часто ускладнене. Це призводить до інтенсивного процесу автолізу, що відбувається у глибоких ділянках біопату (рис. 1.2.5).

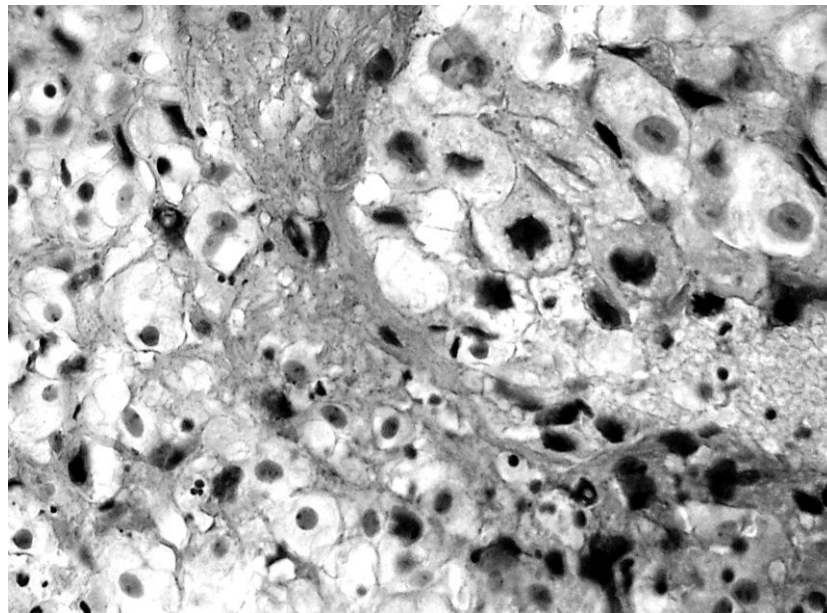


Рис. 1.2.5 – Результат фіксації шматочка печінки (10,0x10,0x010 мм)
сольовим формаліном протягом 20 годин.
Гематоксилін Гейденгайна, фукселін Харта, 400х

Таким чином, з метою досягнення кращих результатів фіксації, необхідним є більш тонке препарування шматочків тканини. Його виконують за допомогою ножа Автандилова, але у подальшому важко проводити вилучення отриманого тканинного блоку з вузького зазору між лезами.

Якщо дозволяє щільність тканини, можна зробити тонке препарування шматочків за допомогою спеціальних різаків. Фірма Thermo (Німеччина) пропонує набір ножів-пінцетів для вирізання гістологічних зразків та виготовлення препаратів певної товщини (рис. 1.2.6).



Рис. 1.2.6 – Набір для вирізки гістологічних зразків
«Cut MATE» (Німеччина)

Набір складається з 3-х щипців, що дозволяють вирізати шматочки тканин 2,0, 3,0, або 4,0 мм, а також щипців, за допомогою яких можна вирізати шматочки різної товщини в діапазоні 2,0-4,0 мм.

Вирізання зразка тканини можна досить якісно виконати вручну лезом безпечної бритви (але не скальпелем): потрібно зменшити товщину (висоту) шматочка до 0,5-1,0 мм (Козій М.С. [2, 4]). Якість фіксації об'єкта в цей час значно покращується, також пропорційно скорочується її час.

Д. Кількість фіксатора має бути досить великою. Його об'єм обов'язково повинен перевищувати кількість досліджуваного матеріалу у 25-30, а іноді і у 50 разів. Недостатня кількість фіксуючої рідини майже завжди призводить до незадовільних результатів фіксації. Винятком є дуже щільні тканини – кількість фіксуючої рідини, для їх обробки можна брати в меншому об'ємі (1:5 (10)).

Е. Не допускати стикання шматочків тканини під час фіксації. Особливо потрібно уникати контакту тканин, що мають ферментативну активність (ділянки кишечника, печінки, підшлункової залози). З цією метою

можна використовувати бавовняні, скловолоконні, ватяні або марлеві прошарки.

Ж. Фіксатор слід змінити як мінімум двічі. Фіксація матеріалу, багатого на кровоносні судини, завжди супроводжується виділенням крові у фіксатор, внаслідок чого процес консервації значно погіршується і подовжується у часі. Зміна фіксатора обов'язкова, сигналом завершення процесу слугує припинення витікання з тканини крові та швидке придбання нею бурого кольору. Цих правил дотримуються також під час фіксації тканин, до складу яких входить секреторний епітелій.

Аналіз літературних даних показує, що не існує жорстких правил стосовно фіксації різнорідних тканин. Результати наших досліджень часто не узгоджуються з результатами більшості дослідників: щодо кожного виду тканини потрібно ретельно підбирати як тип фіксатора, так і індивідуально визначати оптимальний час перебігу процесу (табл. 1.2.1).

Таблиця 1.2.1 – Схема фіксації тканин

Фіксатор	Концентрація, С, %	Товщина шматочка мм	Температура, °С	Оптимальний час фіксації, год	Переважно використовується для фіксації тканин
Суміш					
Реактив Ружа	—	0,5 – 1,5	25 – 30	6,0 – 10,0 6,0 – 10,0 2,0 – 6,0 1,5 – 4,0	епітеліальна нервова пухка сполучна ембріональна
			40 – 45*	8 – 10 10 – 12 9 – 11	м'язова (усі типи) щільна сполучна епітеліальна (покривна)

Продовження таблиці 1.2.1

Реактив Буена**	—	0,5 – 1,5	25 – 30	5 – 8 5 – 8 1,5 – 5 1 – 3,5	епітеліальна нервова пухка сполучна ембріональна
			40 – 45	7,0 – 9,0	м'язова (усі типи)
				9,0 – 11,0	щільна сполучна
				8,0 – 10,0	епітеліальна (покривна)
простий фіксатор					
Формалін	4 – 5	0,5 – 1,5	25 – 30	8,0 – 12,0 5,0 – 8,0 5,0 – 7,0 3,5 – 8,0	епітеліальна нервова пухка сполучна ембріональна
			40 – 45	12,0 – 20,0	м'язова (усі типи)
				18 – 24,0	щільна сполучна
				10 – 15,0	епітеліальна (покривна)
Метанол	70 – 100***	0,5 – 1,5	25 – 30	4,0 – 7,0 6,5 – 9,5	нервова пухка сполучна
			40 – 45	4,5 – 8,0	епітеліальна
			Етанол	100	0,5 – 1,5
40 – 45	9,5 – 14,0	епітеліальна			
Ацетон безводний	100	0,5 – 1,5	25 – 30	1,0 – 4,0 2,5 – 5,5 3,0 – 6,0	ембріональна пухка сполучна нервова
			40 – 45	3,5 – 7,0	епітеліальна

Примітка: * підвищення температури вище цієї позначки не рекомендується щоб уникнути теплової коагуляції; ** у нашій модифікації; *** 70%-й метанол застосовується лише у виняткових випадках.

Згідно з даними таблиці, якщо при температурі 40-45°C фіксуються м'які тканини, то час їх знаходження у фіксаторі зменшується в 1,5-2,0 рази (для 4-5% формаліну воно становить 3,0-4,5 год.; для суміші Ружа – 2,0-3,5 год.; для суміші Буена – 1,5-3,3 год. відповідно).

Доведено, що у разі збереження значення концентрації фіксуючого розчину (або його компонентів) зі збільшенням температури відповідно зменшується час фіксації. Ми вважаємо, що тканини щільної консистенції, незалежно від температурного режиму процесу, необхідно фіксувати дещо довше.

G. Kiszely [39] вважає, що безводний ацетон є непридатним для фіксації ембріональних тканин. Нами доведена можливість застосування цього фіксатора щодо зародкового матеріалу: незважаючи на деякий ступінь його стиснення, було отримано цілком задовільні результати незалежно від температурного режиму процесу фіксації (Козій М.С. [2, 4, 8]).

1.3 Промивання

Сутність процесу промивання полягає в тому, що стиснуті та зморщені в процесі фіксації тканинні елементи під час вимивання фіксатора відновлюють об'єм, тобто набухають (наповнюються водою). Промивати фіксований матеріал слід обережно. З цією метою в гістологічних лабораторіях використовують широкогорлу склянку, в яку безперервно наливають тонкий струмінь холодної (10-15 °C) водопровідної води.

Для якісного промивання гістологічного матеріалу використовуються різноманітні пристрої, або промивальниці. При існуючому різноманітті їх конструкцій, найчастіше використовується промивальниця сифонового типу (рис. 1.3.1).

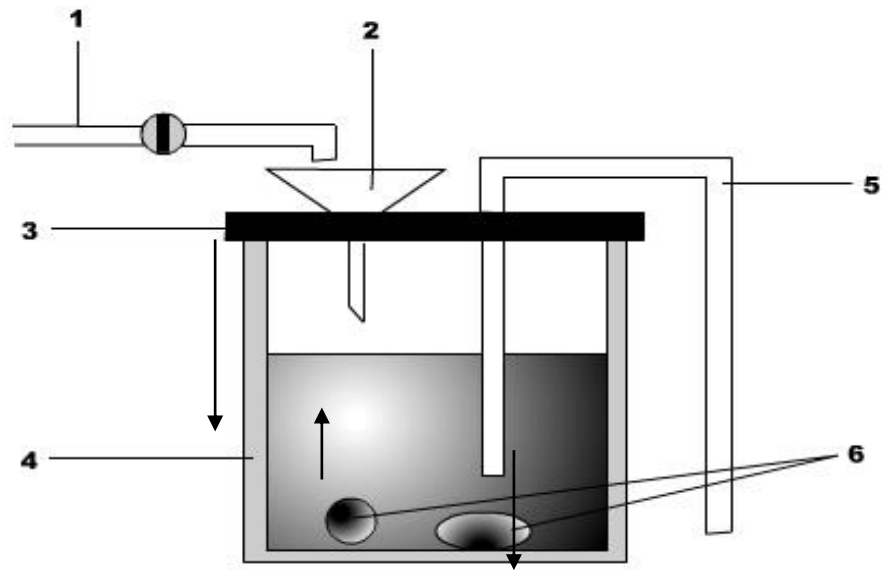


Рис. 1.3.1 – Сифонова промивальниця

- 1 – кран;
- 2 – лійка;
- 3 – гумова пробка;
- 4 – широкогорла банка;
- 5 – трубка-сифон;
- 6 – тканинні фіксати.

Сила та швидкість потоку води, а також рівень входу сифона в приладі за необхідності можуть регулюватися, що дає можливість промивати тканини з різним ступенем інтенсивності. Матеріал, фіксований за допомогою суміші Ружа ми рекомендуємо промивати трохи більше – 0,5-1 год.; фіксатор Буена потрібно видаляти із тканин дещо довше – протягом 2-3 год. Пухкий матеріал звичайно рекомендують зав'язувати у марлеві мішечки. Для його промивання можна скористатися наступним нескладним пристроєм (рис. 1.3.2).

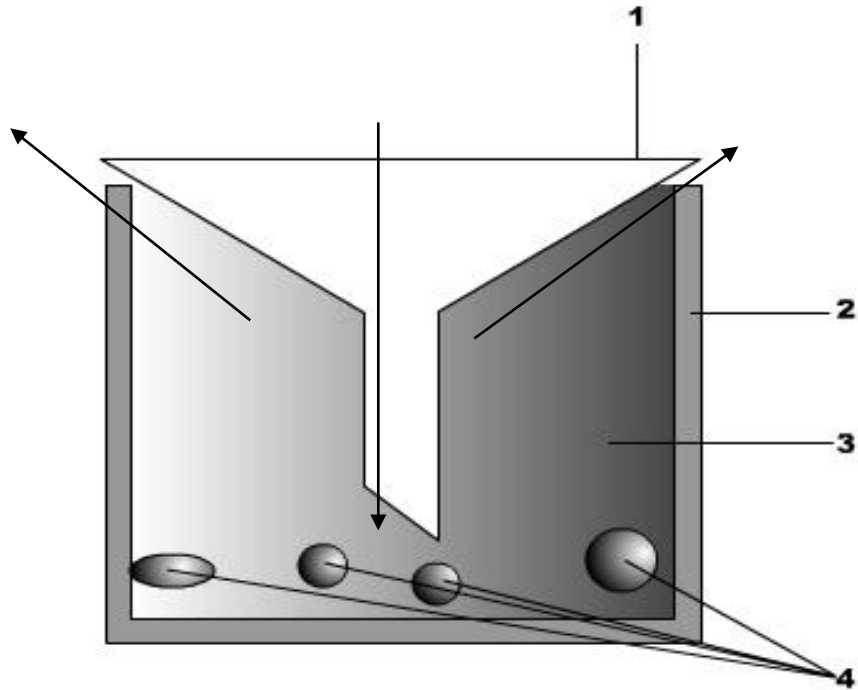


Рис. 1.3.2 – Воронкова промивальниця для пухких тканин

- 1 – лійка;
- 2 – склянка;
- 3 – вода;
- 4 – тканинні фіксати.

Слід пам'ятати, що в процесі промивання тканини м'якої консистенції досить легко пошкоджуються. У зв'язку з цим, ембріональний матеріал (як порізані фрагменти, так і цілі ембріони) рекомендовано поміщати в промивальницю особливої конструкції, спеціально розроблену нами для цієї мети (рис. 1.3.3).

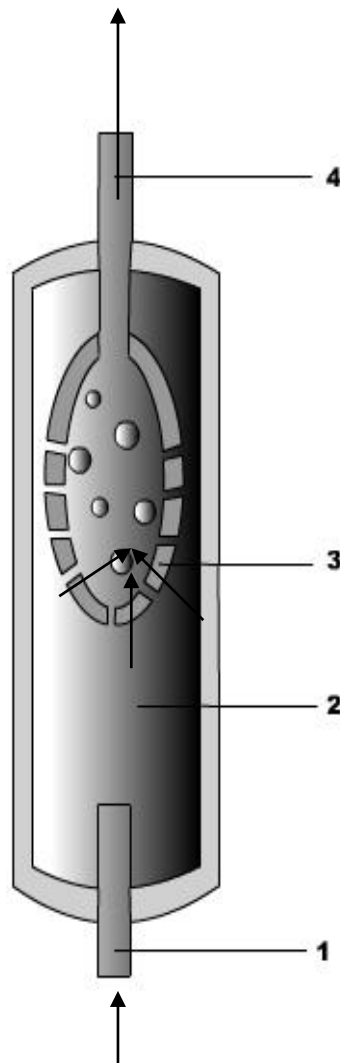


Рис. 1.3.3 – Двохкамерний бюкс для промивання ембріональних тканин

- 1 – вхідний сифон камери основного водозабірника;
- 2 – камера основного водозабірника;
- 3 – перфорована камера;
- 4 – вивідний сифон перфорованої камери.

Переваги цього пристосування порівняно з сифоноюю та лійковою промивальницями полягають у наступному:

- 1. немає необхідності у регулюванні сили та швидкості потоку води, оскільки його регулятором є отвори перфорованої камери;
- 2. як фіксатор пухкого матеріалу виступає обмежений простір перфорованої камери.

Промивати ембріональні тканини у двохкамерному бюксі протягом 0,2-0,3 годин більш безпечно, ніж промивати їх в інших пристроях за той же проміжок часу.

Glick D. [31], Mc Manus J. F. A. [48] вказують, що процес промивання для більшості гістологічних об'єктів досить тривалий і становить в середньому близько 20-24 год. Ми вважаємо, що тривале промивання доцільне лише в тому випадку, коли використовувалися фіксатори, що містять концентровані розчини формаліну та кислот, а також у разі занадто великих або занадто щільних шматочків тканини.

Враховуючи результати власного досвіду, а також результати роботи деяких гістологічних лабораторій, можна стверджувати, що промиванням тканин, фіксованих розбавленим (4-5%) формаліном, у ряді випадків можна знехтувати, так як у фіксатах вже є велика кількість води.

1.4 Зневоднення (дегідратація) матеріалу

Фіксатори в процесі обробки більш менш ущільнюють матеріал, проте на практиці твердість, необхідна для виготовлення тонких зрізів, досягається додатковим ущільненням. Щодо його ступеню певних правил не існує, але занадто ущільнений матеріал погано піддається різанню, тому процедуру слід проводити з обережністю.

Для заливання в парафін (парафін-целоїдин) необхідним є не тільки ущільнення, але і зневоднення (дегідратація) матеріалу, яке вважається першочерговим та обов'язковим. В цей час можливі подвійні помилки: хороше зневоднення з зайвим ущільненням матеріалу і нормальне ущільнення, але недостатнє зневоднення. Для встановлення оптимального режиму, безперечно, потрібна велика практика. Так, під час зневоднення тканин в етанолі, слід пам'ятати, що вода, яка витісняється спиртом, має більшу щільність, ніж дегідратуючий агент. У зв'язку з цим, знаходження шматочків на дні ємності є неприпустимим.

Найчастіше для зневоднення добре фіксованого матеріалу застосовують етанол (C_6H_5OH) та ацетон (CH_3COCH_3). Ці речовини поєднують властивість осаджувати білки. Це осадження білків значною мірою є зворотним, тому що під час дії дегідрататора на білкові молекули у поліпептидах відбуваються неглибокі зміни, при додаванні води вони відновлюються.

У разі застосування етанолу, для знаходження об'єкта у менш концентрованій частині висхідного спиртового ряду потрібно 2-4 години, потім матеріал залишають на 12 годин у 70-80% спирті. Після цього його через кожні 6 годин поміщають у більш концентрований (96%) спирт, який необхідно кожні 3 години змінювати. Kiszely G. [39] рекомендує 3 варіанти спиртового проведення: 70%, 96 та 100% (прискорений спосіб); 60%, 80, 96 та 100% (звичайний спосіб) або 30%, 40, 50, 60, 70, 80, 96, 100% (уповільнений спосіб, призначений для ніжних тканин). Практикою доведено, що такі підходи часто призводять до надмірного ущільнення та стискання тканин.

Можна застосувати більш простий спосіб зневоднення – за допомогою ацетону: шматочки тканин товщиною 3,0 мм помістити на 60-90 хвилин у безводний ацетон (його обсяг повинен перевищувати розміри матеріалу в 25-30 разів). Потім дегідрататор необхідно двічі або тричі змінити. Процедура зневоднення можна проводити за кімнатної температури.

Багаторазово здійснивши випробування цих способів, ми дійшли висновку, що їх без шкоди можна застосовувати лише стосовно нервової, м'язової, щільної сполучної та деяких різновидів епітеліальної тканин. Тканини пухкої консистенції та багаті на воду, під час зневоднення такими методами сильно деформуються; відмічені випадки їх часткового руйнування.

У доступних літературних джерелах відсутні повідомлення щодо застосування метилового спирту (CH_3OH) як самостійного агента для зневоднення. У нашій практиці він знаходить застосування, як один із найефективніших дегідрататорів (Козій М.С. [2, 4]). Якість зневоднення гістологічних об'єктів метанолом набагато вища, ніж етанолом або безводним

ацетоном: найкраще це вдається у разі його короткочасного використання, за кількості змін спирту – дещо більше двох.

Як і у випадку фіксації, щодо кожного дегідрататора необхідно індивідуально визначати оптимальний час знаходження об'єкта у середовищі, що зневоднює. Якщо підвищення температури фіксатора сприяє скороченню часу технологічного процесу, то стосовно зневоднення тканин це правило також є ефективним.

З метою підвищення якості зневоднення тканин риб нами запропоновані наступні режими дегідrataції (табл. 1.4.1).

Таблиця 1.4.1 – Режими зневоднення (дегідратації) ембріональних
тканин

Дегідрататор	Концентрація, С, %	Товщина шматочка, мм	Температура, °С	Оптимальний час дегідратації, хв	Кількість замін
Етанол	70	0,5 – 1,0	25 – 30	50 – 60	1
	96			20 – 30	1
	70		40 – 45	40 – 50	1
	96			15 – 25	1
Метанол	100	0,5 – 1,0	25 – 30	15 – 20	1
				10 – 15	1
	100		40 – 45	10 – 15	1
				8 – 10	1

Продовження таблиці 1.4.1

Ацетон безводный*	100	0,5 – 1,0	25 – 30	10 – 15	1
				5 – 10	1
	100		40 – 45	8 – 10	1
				5 – 8	1

*Температура кипіння ацетону – 56,2°C.

Як видно з таблиці, фіксована товщина об'єкта передбачає досить швидке та якісне проведення тканинних блоків через ряди дегідрататорів. Це дозволяє отримати покращені результати зневоднення та, відповідно, якісніше підготувати матеріал до проведення операції освітлення.

У доступній літературі відсутні будь-які повідомлення щодо скорочення часу процесу фіксації за рахунок можливостей спиртів та ацетону виконувати одночасно функції фіксуючих речовин та дегідрататорів. Результати наших досліджень свідчать про доцільність такого комбінованого підходу (табл. 1.4.2).

Таблиця 1.4.2 – Комбіновані варіанти фіксації та зневоднення
ембріональних тканин

Фіксатор	№ з/п	Температура технологічних операцій, °C	Мінімальний час фіксації, год.*	Дегідрататор	Мінімальний час гідратації, хв.**
Формалін 4 – 5%	1	25 – 30	11,0	етанол (96%)	40 x 2***
	2			метанол (100%)	15 x 2
	3			ацетон (100%)	10 x 2
	4	40 – 45	5,5	етанол (96%)	20 x 2
	5			метанол (100%)	7 x 2
	6			ацетон (100%)	5 x 2

Продовження таблиці 1.4.2

Суміш Ружа	7	25 – 30	8,0	етанол (96%)	30 x 2***
	8			метанол (100%)	15 x 2
	9			ацетон (100%)	10 x 2
	10	40 – 45	4,0	етанол (96%)	15 x 2
	11			метанол (100%)	7 x 2
	12			ацетон (100%)	5 x 2
Суміш Буена	13	25 – 30	6,0	етанол (96%)	30 x 2***
	14			метанол (100%)	15 x 2
	15			ацетон (100%)	10 x 2
	16	40 – 45	3,0	етанол (96%)	15 x 2
	17			метанол (100%)	7 x 2
	18			ацетон (100%)	5 x 2

* Мінімальні середні значення часу фіксації;

** Мінімальний час дегідратації збільшено в середньому 0,08 год;

*** 2 зміни проводки.

Аналізуючи дані таблиці, можна зробити висновок, що зі зменшенням часу фіксації доцільно збільшити час дегідратації, причому при підвищенні температури до 40-45°C зменшувати час зневоднення не рекомендується (варіанти №№5-18). Це необхідно тому, що потрібен деякий час для успішного проходження дегідратором бар'єру з осажденного фіксатором білка.

Скорочений час технологічних операцій дозволяє успішно використовувати варіанти № 2, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 як у повсякденних гістологічних дослідженнях, так і в режимах експрес-діагностики (Козій М.С. [2]).

Необхідно відзначити, що вищевказані методи зі змінним успіхом можна застосовувати на щільних тканинах: результати прискореної комбінованої фіксації та дегідратації хряща та кісток деяких вікових категорій у ряді випадків незадовільні.

1.5 Обробка матеріалу у інтермедіаторі

Після того, як гістологічний матеріал зневоднений, його занурюють в інтермедіатор, тобто речовину посередник між спиртом і парафіном. Виконання цієї операції є необхідним з огляду на те, що спирт і парафін не розчиняються один в одному. Розчинник парафіну, що відіграє роль проміжної рідини, повинен відповідати таким вимогам:

- добре змішуватись зі спиртом;
- добре розчиняти парафін за нормальної температури його плавлення (50-58°C);
- порівняно легко випаровуватися при цій же температурі.

На практиці у якості інтермедіаторів найчастіше використовують гомологи ароматичного ряду: бензол (C_6H_6), толуол ($C_6H_5CH_3$) і ксилол, або диметилбензол ($(CH_3)_2C_6H_4$). Останній існує у вигляді трьох ізомерів: О-к. (Орто-ксилол), М-к. (Мета-ксилол), П-к. (Пара-ксилол). Орто-ксилол є інтермедіатором який використовується найчастіше. Він також токсичний, як і інші гомологи ароматичного ряду, але порівняно менш леткий (Kirk P., Othmer K. [37, 38]), і, як наслідок, не такий небезпечний.

Основні властивості інтермедіаторів наведено у таблиці 1.5.1.

Таблиця 1.5.1 – Властивості інтермедіаторів

Інтрамедіатор	% розчинення парафіну при 50°C в грамах на 100 гр розчинника	Температура кипіння, °C	Розчинність у спирті
ксилол	20,8	140	дуже гарна
бензол	21,5	80	гарна
толуол	25,0	11	важко розчиняється
ацетон	16,4	56	середня
діоксан	0,2	101	гарна

З таблиці видно, що вимогам, що висуваються, найчастіше відповідає ксилол: реактив виробництва київського виробничого об'єднання «Ріан» (МРТУ 6-09-3839-67), який відрізняється гарною якістю.

У численних довідкових посібниках вказується, що час утримання гістологічних об'єктів в О-ксилолі може досягати порядку 6-8 год. (Eranko O. [26]). Існує також думка, за якою деякі типи тканин можуть перебувати в інтермедіаторі необмежено довго (Szukcs I. [61]). Вважається, що перед заливанням до парафіну, необхідно змінити реактив двічі, а також пізніше розмістити тканини в суміші рівних частин О-ксилолу та парафіну («парафінової каші») протягом 12-24 год.

Наші дослідження показують, що тривале перебування тканин в О-ксилолі призводить до їх зайвої крихкості. Відзначено також випадки надмірного ущільнення тканин паренхіматозних органів: парафінові блоки із залитими в них шматочками викликали псування вістря мікромомного ножа та направляючої пластини мікротома.

Робота з об'єктами, що мають фіксовану товщину (0,5-1,0 см), дозволяє використовувати практично тільки одну зміну О-ксилолу. Звичайно повне заміщення спирту (ацетону) інтермедіатора відбувається протягом 0,3-0,4 годин. Проте, у ряді випадків завершення операції відбувається набагато швидше. Критерієм повного заміщення є своєрідний вигляд шматочка тканини та його розташування у ємності з інтермедіатором: він майже прозорий і завжди перебуває у зануреному стані. Якщо в товщі шматочка спостерігається невелике помутніння – це означає, що в об'єкті є сліди вологи. У цьому випадку зневоднення та освітлення необхідно провести повторно.

Примітно, що за такого способу підготовки об'єктів до занурення в розплав парафіну, можна знехтувати процедурою розміщення тканин у парафіновій каші (Козій М.С. [6]). Це нововведення дає можливість економити час, реактиви, і, головне, запобігти надмірному ущільненню і крихкості гістологічних об'єктів.

Враховуючи досвід багатьох гістологічних лабораторій, застосування хлороформу як інтермедіатора є найменш бажаним у зв'язку з високим ступенем його гігроскопічності та випаровуваності – це спричиняє незадовільну якість просочення об'єкта парафіном: як заміник О-ксилолу можна рекомендувати реактив «Shantune Sub». Ця речовина є екологічно безпечним заміником хлороформу та діетилендіоксиду: втричі менше агресивна, практично не має запаху, абсолютно нешкідлива для неушкодженої шкіри.

1.5.1 Ацетон та діетилендіоксид, як альтернативні інтермедіатори

У гістологічній практиці відомі деякі речовини, які здатні виконувати одночасно функцію дегідрататора та інтермедіатора: ними є безводний ацетон (CH_3COCH_3), ізобутиловий спирт ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$) і діоксан, або діетилендіоксид ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) (Gomori G. [32]). З перерахованих реактивів в Україні найрідше застосовується ізобутиловий спирт.

Діоксан існує у вигляді трьох ізомерів: 1,2Д.; 1,3Д.; 1,4Д., з яких застосовується лише останній (діетилендіоксид). Це безбарвна рідина, надзвичайно гігроскопічна, має різкий запах. У лабораторній практиці ця речовина найчастіше застосовується за спрощеною схемою проведення матеріалу:

- 1) діоксан 100% I, 2-4 год;
- 2) діоксан 100% II, 2-4 год.;
- 3) діоксан 100% III, 2-4 год.;
- 4) діоксан 100% (1 ч.) + парафін (1 ч.), 1-2 год.

Існують також інші варіанти обробки матеріалу із застосуванням діоксану. Незважаючи на зручність застосування, діоксан використовується нами рідко, з

одного боку, через високу вартість, з іншого – через високий ступінь токсичності та канцерогенності.

Також відомо, що під час контакту діетилендіоксиду з повітрям у ньому накопичуються вибухові пероксиди, що додатково збільшує рівень його небезпеки. Показано необхідність використання діоксану класу «Ч.Д.А.», оскільки час перебування у ньому гістологічного матеріалу значно скорочується. На практиці нами було випробувано діетилендіоксид виробництва кількох хімічних об'єднань та різних класів чистоти: доцільність такого підходу є очевидною (табл. 1.5.1.1).

Таблиця 1.5.1.1 – Залежність часу проведення матеріалу з фіксованою товщиною від якості діетилендіоксиду

Країна виробник	Виробниче об'єднання	Клас	Загальний час проведення, год.
Угорщина	«Reanal»	Х.Ч.	до 0,5
		Ч.Д.А.	до 0,4
Словенія	«Merkanhim»	Х.Ч.	до 1,0
		Ч.Д.А.	до 1,2
Україна	«Реахим»	Х.Ч.	до 1,5
		Ч.Д.А.	до 2,0

Безводний ацетон, внаслідок своєї порівняно малої токсичності, застосовується частіше за діетилендіоксид. Це безбарвна гігроскопічна рідина, що має характерний запах. Як і діоксан, він добре поєднується з водою і розчиняється в розплавленому парафіні. При використанні цієї речовини необхідно пам'ятати, що вона токсична, під час вдихання накопичується в організмі і важко виводиться з нього (Kirk P., Othmer K. [37]).

Othmer K. [38] вказує на деякі труднощі застосування ацетону як інтермедіатора: парафін при змішуванні з ним, навіть у невеликих кількостях,

стає крихким. Всупереч цьому твердженню, ми отримали цілком задовільні результати під час обробки ембріональних тканин (Козій М.С. [6]).

У доступній літературі відсутні дані, що описують зовнішній вигляд гістологічних об'єктів на початку та наприкінці їх знаходження у ацетоні та діоксані. Наші спостереження показали наступне (табл. 1.5.1.2).

Таблиця. 1.5.1.2 – Зміна зовнішнього вигляду гістологічних об'єктів під час їх зневоднення в ацетоні та діоксані

Заміна №п/п	Інтермедіатор			
	ацетон		діоксан	
	розташування в ємності	колір, прозорість	розташування в ємності	колір, прозорість
1	на дні	помірне побіління, прозорість	на поверхні	непрозорість
2	на дні	значне побіління, прозорість	на дні	напівпрозорість

Використання цих даних дозволяє уникнути помилок, пов'язаних із надмірним ущільненням шматочків тканин внаслідок їхньої перетримки в дегідрататорах.

1.6 Заливання у парафін (парафін-целоїдин)

Заливання гістологічних об'єктів у парафін має свої особливості (Gomori G. [32]). Відомо, що сортами парафіну які найбільше для цього підходять є ті, які плавляться в діапазоні температур 52-55°C. Парафіни, що плавляться за температури нижче 52°C, мають тонку зернисту структуру, проте занадто м'які і непридатні для використання під час теплої пори року. Тугоплавкі сорти (56°C і вище) також не рекомендуються до повсякденного

застосування внаслідок перевищення їх точки плавлення верхньої межі температурного режиму вітчизняних моделей термостатів (ТМ-1; ТМ-2М). Під час перенесення гістологічних об'єктів, в термостатних ємностях неминуче відбувається теплообмін з навколишнім середовищем, внаслідок чого температура повітря в робочій камері термостата різко знижується (тепла пора року – до 2°C; в холодну – до 5°C відповідно). На поверхні розплаву парафінової суміші в цей час утворюється скоринка, що ускладнює перенесення гістологічного матеріалу з ємності у ємність і є також причиною небажаного подовження часу просочування парафіном тканин.

Для успішної роботи з різноманітними гістологічними об'єктами необхідно мати набір парафінів із різною температурою плавлення (табл. 1.6.1).

Таблиця 1.6.1 – Характеристика деяких сортів парафіну (парапласту),
що вироблені в Україні

Найменування	«Парапласт»	«Парапласт-плюс»	«Парафін – Екстра»	Суміш для заливання «Cut»
форма випуску	палет	палет	палет	палет
температура плавлення	56 – 57°C	56°C	50 – 54°C	52 – 54°C 56 – 58°C 62 – 64°C
призначення	загальне	глибока інфільтрація, нарізка	тонка нарізка	глибока інфільтрація, заливка, тонка нарізка з можливістю тривалого використання ножа

Визначити температуру плавлення парафіну у лабораторії неважко. Для цього потрібно заповнити скляний капіляр малого діаметра досліджуваним парафіном і прив'язати його до термометра, який потім занурюють у судину з водою, що повільно нагрівається. Безперервно помішуючи воду термометром, спостерігають за ним та станом капіляра. Потрібно відзначити температуру води в той момент, коли парафін у капілярі відразу стане прозорим, тобто розплавиться. Це буде температура плавлення парафіну. Дослід рекомендується повторити кілька разів та взяти середню величину.

Парафін (ДСТУ 364. 9910.78), що зараз є у продажі завжди крупнокристалічний і хімічно неоднорідний: у своєму складі він має пилові включення та різноманітні газові домішки (рис. 1.6.1).



Рис. 1.6.1 – Мікроскопічна структура негомогенізованого парафіну. 200х

Зважаючи на кристалічність продажного парафіну його необхідно гомогенізувати, тобто надати йому додаткову аморфність і пластичність.

Гомогенність парафіну є дуже важливою технічною якістю, від якої залежить товщина зрізів, що виготовляються: з гомогенізованого (пластичного) парафіну зрізи будуть значно тоншими, ніж зі звичайного продажного. Рекомендовано довести парафін до кипіння, потім, поступово охолодивши його до температури точки плавлення, витримати у термостаті протягом кількох діб – в цей час тверді домішки осядуть на дно, а газоподібні речовини – зникнуть.

Також, є необхідність додаткової гомогенізації суміші: рекомендовано швидке охолодження у воді, внаслідок чого крупнокристалічна структура зникає: після остаточного затвердіння парафін на місці зламу або зіскрібку однорідно матовий.

Дати якісну оцінку отриманим результатам гомогенізації парафіну під час різних способів охолодження можна, здійснивши мікроскопію тонких «холостих» зрізів (товщиною 5-6 мкм) у ковзаючих променях світла. Так, у парафіні, який піддавали повільному охолодженню, розміри кристалів (гранул) коливаються у діапазоні 4,0-12,0 мкм: 4,0-6,0 мкм – 5%, 7,0-9,0 мкм – 30%, 10,0-12,0 мкм – 65% відповідно (рис. 1.6.2).



Рис. 1.6.2 – Мікроскопічна структура парафіну, що був гомогенізований шляхом повільного охолодження. 200х

Під час швидкого охолодження парафіну розміри гранул коливаються в діапазоні 3,0-8,0 мкм (3,0-4,0 мкм – 25%, 5,0-6,0 мкм – 25%, 7,0-8,0 мкм – 50% відповідно). Кристали мають переважно еліпсоподібну форму, лише невелика їхня кількість – округлу або полігональну (рис. 1.6.3).

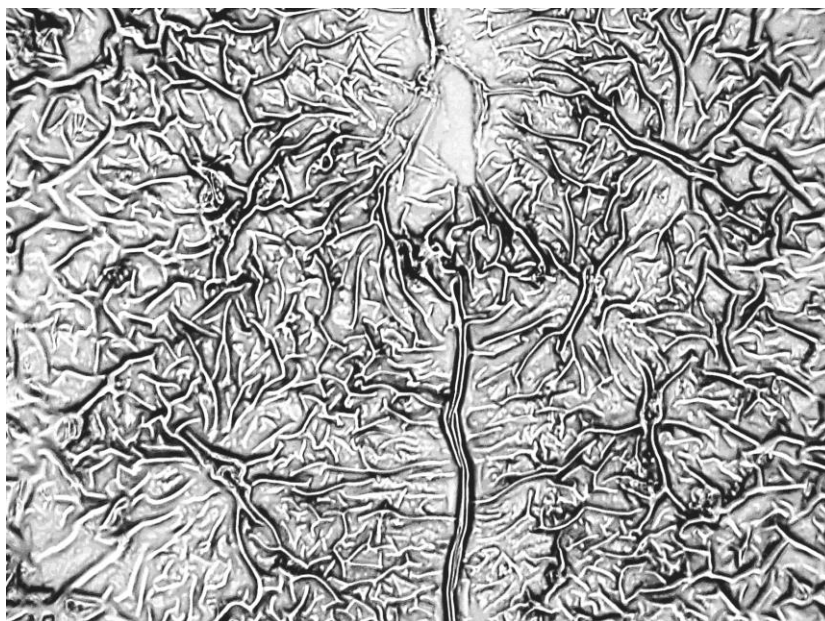


Рис. 1.6.3 – Мікроскопічна структура парафіну,
що був гомогенізований шляхом швидкого охолодження. 200х

Таким чином, незалежно від способу гомогенізації, чистий парафін зберігає крупнокристалічну структуру. Проаналізувавши результати двох способів гомогенізації, можна віддати перевагу другому: швидке охолодження, можливо зупиняє ініціацію, формування та подальший ріст парафінових кристалів.

Деякі закордонні фірми («Immunex Corporation», USA; «Cantab Pharmaceuticals LTD», Cambridge; «Libre», Belgium) пропонують у продаж готовий до використання очищений і гомогенізований парафін («Paraffin-wax», «Paraffin-embedding molds», «Paraffin medium-8», «Polyffin JB-4»), проте на українському ринку ці ущільнюючі середовища є коштовними або недоступними. Наші спостереження показують, що використання деяких закордонних марок середовищ для заливання дає дуже посередні результати: зрізи, отримані з них, мали безліч мікротріщин, а в окремих випадках – поодинокі розриви (рис. 1.6.4).

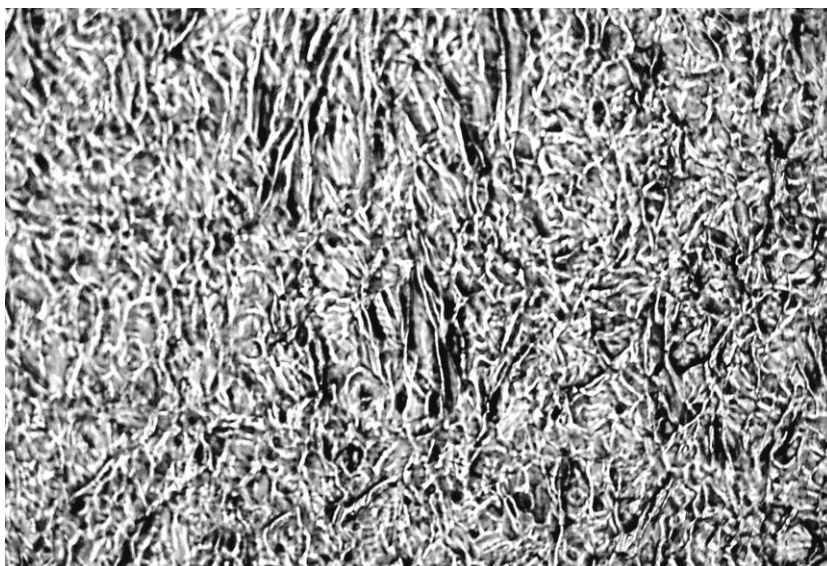


Рис. 1.6.4 – Мікроскопічна структура парафіну марки «Polyffin JB-4», («Libre», Belgium). 200x

Найбільш імовірною причиною таких дефектів є зіткнення у процесі різання великого розміру кристалів з вістрям ножа мікротома. Оскільки гранули більш щільні, ніж тонкі шари парафіну, що їх зв'язують; вони не тільки затримуються вістрям, а й прокручуються відносно нього. Внаслідок розбіжності векторів направляючої сили різання до положення стосовно неї кристалів виникає сила, що розриває зріз. Таким чином, навіть добре гомогенізований парафін має швидше більшу крихкість, ніж пластичність. Додаткової пластичності йому надають шляхом додавання сполучних агентів, наприклад деяких восків. Звичайно в парафін, попередньо гомогенізований і повторно розплавлений на водяній бані, додають не більше 5% попередньо очищеного бджолиного воску. Такий пропис тривалий час вважався оптимальним і нині також широко застосовується в багатьох гістологічних лабораторіях: він забезпечує задовільну пластичність суміші, але є неоднаково придатним для використання у різні пори року.

Мікроскопія тонкого (5,0 мкм) «холостого» зрізу бджолиного воску показала, що його структура є тонкозернистою: гранули мають кулясту або еліптичну форму і менші розміри у порівнянні з парафіновим гомогенізатом (рис. 1.6.5).

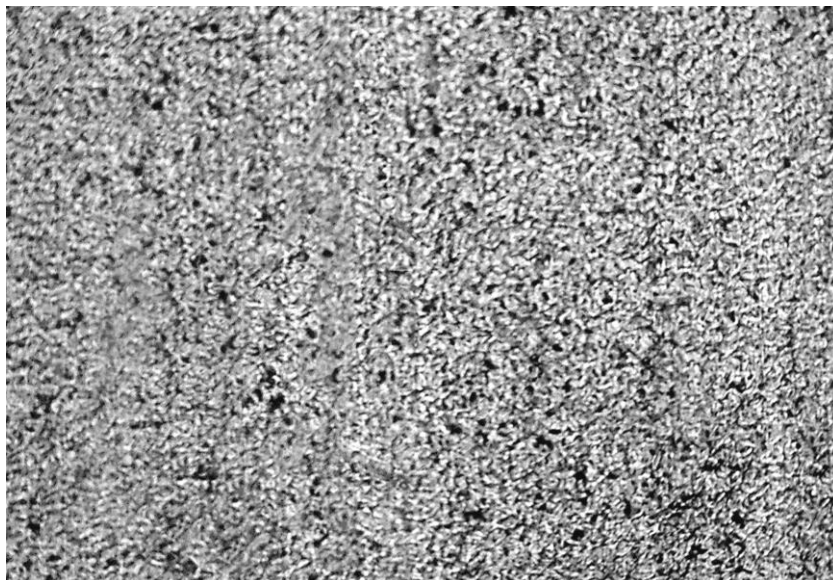


Рис. 1.6.5 – Мікроскопічна структура бджолиного воску. 200х

Чистий бджолиний віск не такий крихкий, як парафін, проте має зайву в'язкість і тугоплавкість (температура плавлення – 78°C), у зв'язку з чим використання його як середовища для заливання неможливе.

Продажний бджолиний віск звичайно містить частинки пилу, залишки оболонок личинок та інші механічні домішки. Перед додаванням воску у парафіновий розплав його попередньо очищають за допомогою наступного пристосування (рис. 1.6.6).

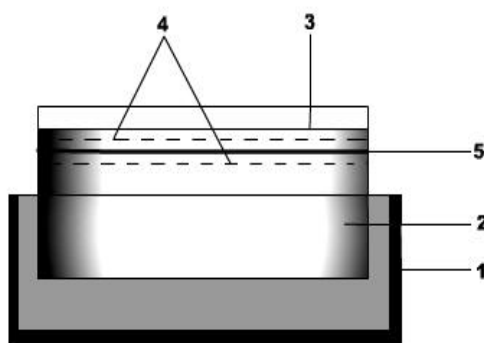


Рис. 1.6.6 – Пристрій для очищення воску від механічних суспензій

- 1 – пісочна (водяна) баня;
- 2 – ємність із водою;
- 3 – рівень води;
- 4 – двошарова металева сітка;
- 5 – віск.

Температура бані (1) повинна бути не меншою за 80°C, але не повинна перевищувати 90°C. Двошарова металева сітка (4) з восковою масою (5) прикріплена гранями до стінок ємності (2) таким чином, що рівень води (3) знаходиться трохи вище за неї.

Час кип'ятіння воску становить близько 4-х годин; за ступенем розплавлення він проходить крізь комірки сітки та піднімається на поверхню води. Подальше відділення воску від води можливе після повного охолодження. Очищення воску від механічних суспензій не дозволяє позбутися від сторонніх хімічних сполук: парафіну, стеарину, каніфолі, різноманітних смол і т. д. Так, щоб переконатися в присутності смол у воску, необхідно виконати наступне (рис. 1.6.7).

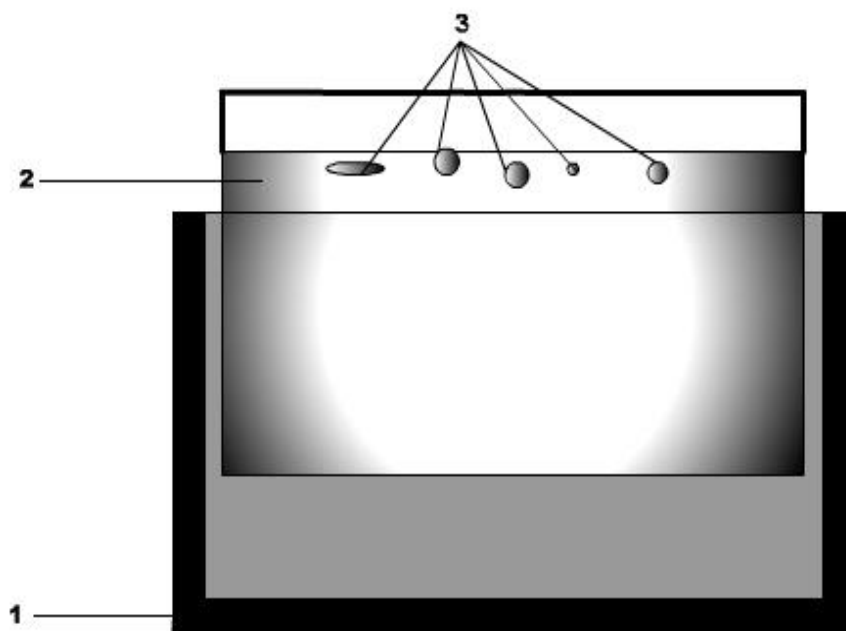


Рис. 1.6.7 – Пристрій для очищення воску від механічних суспензій

- 1 – пісочна (водяна) баня;
- 2 – ємність із водою;
- 3 – рівень води;
- 4 – двошарова металева сітка;
- 5 – віск.

Температура бані (1) повинна бути не меншою за 80°C, але не повинна перевищувати 90°C. Двошарова металева сітка (4) з восковою масою (5) прикріплена торцями до стінок ємності (2) таким чином, що рівень води (3) знаходиться трохи вище за неї.

Час кип'ятіння воску становить близько 4-х годин; у міру розплавлення він проходить крізь комірки сітки та піднімається на поверхню води. Далі відділення воску від води можливе після повного охолодження. Очищення воску від механічних суспензій не дозволяє позбутися від сторонніх хімічних сполук: парафіну, стеарину, каніфолі, різноманітних смол і т. д.

Іноді придатність бджолиного воску для гістологічних цілей можна визначити шляхом його спалювання на полум'ї бунзенівського пальника або пробою «на зуб»: чистий віск під час згорання не дає неприємного диму і не прилипає до зубів. Якщо віск жодної з цих властивостей не має – отже, в ньому є домішка: у першому випадку – парафін, у другому – смола або каніфоль.

Експериментально доведено, що процес очищення та гомогенізації воску та парафіну можна проводити паралельно, а не окремо, як вважалося раніше: це жодною мірою не погіршує якості суміші для заливання. У той же час є підстава стверджувати, що така суміш не універсальна – вона придатна лише щодо заливання тканин досить щільної консистенції (м'язової, щільної сполучної і т. д.), у той час як тканини пухкої консистенції та багаті водою просочуються нею незадовільно. Експериментально встановлено, що вміст воску в гомогенізаті не повинен перевищувати 10-12%: у разі подальшого збільшення його кількості суміш втрачає свою пружність і не набуває додаткової пластичності. Занадто м'яке та в'язке заливальне середовище в процесі різання прилипає до вістря мікротомного ножа, зрізи дуже сильно деформуються і надалі погано розпрямляються. Працювати з ним можна переважно в холодну пору року, діапазон об'єктів, що досліджуються, при цьому не розширюється.

Таким чином, можна зробити висновок, що якість гомогенності та пластичності заливального середовища виділяється наступним:

- кристали (гранули) парафіну в суміші повинні мати еліптичну або кулясту форму та малі розміри (5,0-6,0 мкм);
- вміст у суміші кристалів великих розмірів та інших форм не повинен перевищувати 20%;
- взаєморозташування кристалів має бути максимально близьким: у цьому випадку анастомози пластифікатора коротші і товщі, а зв'язок між компонентами гомогенізату міцніший.

Виходячи з вищесказаного, очевидно, що парафін та пластифікатор взаємодіють у розплавах лише частково; віск є своєрідним «флюсом» між гранулами. Таким чином, проблема підвищення ступеня гомогенізації та пластичності парафіну передбачає низку наступних заходів:

1. Пошук нового пластифікатора, здатного у більшому ступені, ніж бджолиний віск взаємодіяти з парафіном;
2. Визначення оптимальної концентрації нового пластифікатора у суміші;
3. Апробація нового складу суміші в процесі різання на стійкість до розривів та деформацій;
4. Визначення можливості застосування нового складу суміші багатой на воду.

Одним із шляхів вирішення поставленого завдання є заміна бджолиного воску на зуботехнічний або дамарський віск. Він має меншу тугоплавкість (температура плавлення – 67°C), в розплаві краще поєднується з парафіном, у співвідношенні 35:65 (рис.1.6.8).

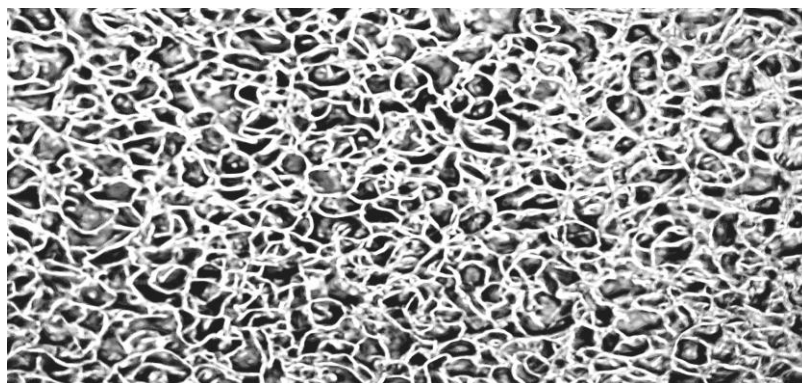


Рис. 1.6.8 – Мікроскопічна структура середовища для заливання «парафін+дамарський віск». 200^x

Як видно з рисунка, кількість парафінових гранул великого розміру в гомогенізації досить велика. Це є доказом невисокого ступеню гомогенізації, що обмежує сферу застосування пластифікатора.

У модифікованій методиці ацетонового зневоднення (Козій М.С. [2]) додаткова пластичність парафіну досягалася заміною бджолиного та дамарського воску на восколїт виробництва харківського об'єднання «Стома» (ДСТУ 64-2-248-79). Восколїт має наступний склад:

- штучний віск (восканол) – 350,0 г; мінеральна олія – 100,0 г;
- карболова кислота (кристал.) – 50,0 г – 17%;
- монтанський віск знесмолений – 3%;
- парафін очищений (ДСТУ 364. 9910.78) – 80%.

Ця речовина є менш тугоплавною, ніж бджолиний і дамарський віск (температура плавлення – 64°C) і краще взаємодіє з розплавленим парафіном. Відзначено, що під час різання блоків на мікротомі показники пластичності та пружності восколїтової суміші значно перевершують показники сумішей з додаванням дамарського або бджолиного воску. Мікроскопічні дослідження «холостих» зрізів товщиною 5 мкм показали, що структура гомогенізату дрібнозерниста, парафінові гранули кулясті, розташовані близько один до одного (рис. 1.6.9).

Восколїт додавався в розплавлений парафін у дещо меншій кількості, ніж дамарський віск (у середньому на 20%) та у більшій кількості (у середньому на 10-15%), ніж бджолиний віск. Емпірично вираховано, що оптимальний вміст восколїту в суміші, в залежності від поставленої мети, коливається в межах 10-20%. Вміст більшої кількості пластифікатора є небажаним у зв'язку з можливим підвищенням температури плавлення суміші: вона може досягти 67-68°C, що є категорично неприпустимим у відношенні до матеріалу, що заливається.

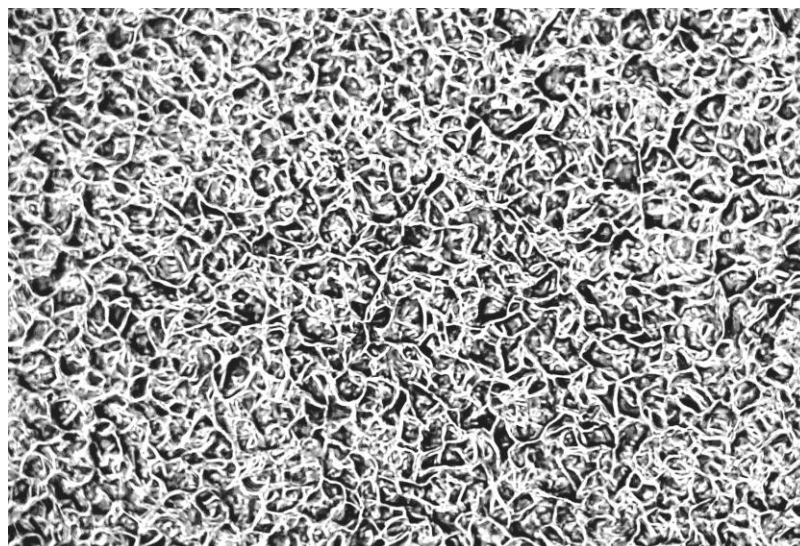


Рис. 1.6.9 – Мікроскопічна структура заливального середовища
«парафін+восколіт». 200^x

Перевага використання восколіту очевидна: якщо з блоків на суміші «парафін, 95%+бджолиний віск, 5%», при високій якості заливання можна отримати гістологічні зрізи товщиною 6,0-7,0 мкм, то при 15% вмісті восколіту у суміші блоки ріжуться набагато краще (товщина зрізів – від 4,0 мкм та вище). Відмінною рисою цього заливального середовища є можливість його використання для заливання тканин, багатих на воду (Козій М.С. [2, 4, 6]).

Забезпечити додаткову пластичність парафіну, а також суттєво покращити його заливальні якості можна наступним способом:

- 1 – у розплав парафіну без попереднього кип'ятіння та гомогенізації вноситься розігрітий ланолін;
- 2 – суміш ретельно перемішується до повного розчинення ланоліну;
- 3 – заливальне середовище повільно охолоджується у воді при температурі 15°C (Козій М.С., Ляшенко Є.В. [6, 8]).

Для реалізації способу проведена порівняльна характеристика різних варіантів отримання заливального парафіну (таблиця 1.6.2).

Таблиця 1.6.2 – Результати отримання парафіну для заливання

Компоненти суміші для заливання	Вміст у суміші, %	Характеристика суміші для заливання		
		пластичність	діапазон робочих температур	мінімальна товщина зрізу
I ВАРІАНТ				
парафін	90	недостатня	30 – 40	6 – 7
ланолін	10			
II ВАРІАНТ				
парафін	75	достатня	15 – 30	1 – 3
ланолін	25			
III ВАРІАНТ				
парафін	60	занадто висока	10 – 15	8 – 10
ланолін	40			

Як свідчать дані таблиці, у разі 1-го варіанта заливальна суміш досить тугоплавка, що робить її непридатною для використання при кімнатній температурі, а мінімальна товщина зрізів не завжди відповідає вимогам мікроскопічної техніки.

У разі 3-го варіанта парафінова суміш надпластична, що викликає її прилипання до мікротомного ножа вже за кімнатної температури; мікроскопічні зрізи товщиною менше 8,0 мкм втрачають цілісність структури (фрагментуються).

Найбільш раціональне співвідношення компонентів заливальної суміші спостерігається у 2-му варіанті: суміш має достатню ступінь пластичності, що дозволяє не тільки зменшити товщину одержуваного мікроскопічного зрізу до 1,0-3,0 мкм, але й значною мірою зберегти його цілісність.

Мікроскопічні дослідження «холостих» зрізів товщиною 5,0 мкм показали, що структура гомогенізату дрібнозерниста, парафінові гранули кулясті, розташовані дуже близько один до одного (рис. 1.6.10).

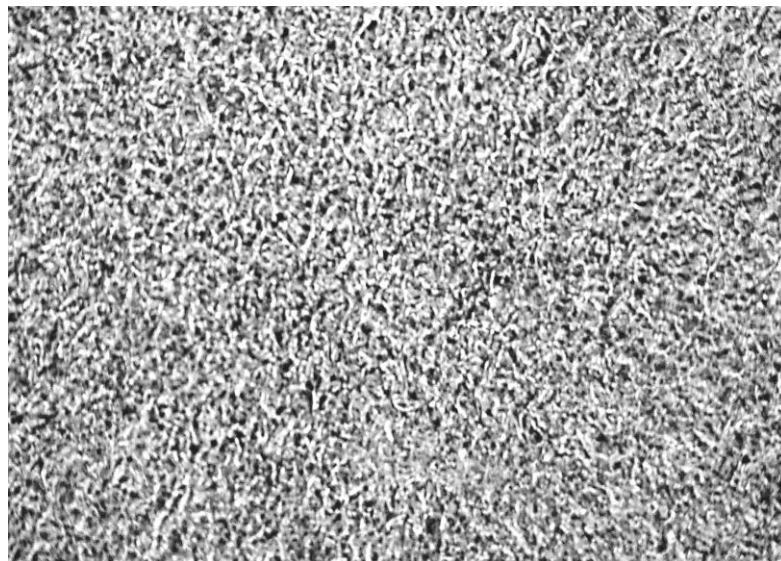


Рис. 1.6.10 – Мікроскопічна структура заливального середовища
«парафін+ланолін». 200х

Відзначено, що при різанні парафін-ланолінових блоків на мікротомі, показники пластичності та пружності суміші значно перевищують суміші, що містять воск. Використання її при заливанні пухких тканин, а також об'єктів, багатих на воду і жовток, дає чудові результати.

Парафін-ланолінове заливальне середовище має наступні переваги перед парафін-восковою та парафін-восколітовою:

1. суміш «парафін (75-80%) + ланолін (20-25%)» готується протягом 20-25 хв., що в 2,3 рази швидше за приготування інших сумішей;
2. суміш відрізняється низьким ступенем термічного розкладання, має точку плавлення 54°C, що можна порівняти з технічними характеристиками вітчизняних моделей термостатів;
3. Заливальний матеріал може використовуватися в досить широкому температурному діапазоні (від 15 до 30°C), що забезпечує можливість його використання незалежно від пори року.

Економічний ефект парафін-ланолінової суміші полягає в енергозбереженні за рахунок скорочення часу роботи лабораторних термостатних установок, а також можливості використовувати даний заливальний матеріал замість дорогих імпортованих гістологічних восків.

1.6.1 Термостат для заливання гістологічних об'єктів у парафін (парафін-целоїдин)

Для заливання тканин до парафіну можна використовувати практично будь-яку модель термостата. Для підтримки постійних температур з тим самим успіхом, як і термостат, можна використовувати водяну (піскову) баню з терморегулятором. У такому обладнанні вміст судин Копліна досить швидко приймає його температуру з відхиленням всього на 1-2°C, причому водяна баня, можливо, забезпечує більш стабільну температуру, ніж термостат.

Необхідно відзначити, що здійснити заливання парафін-целоїдин за методикою М.С. Козія [5], за допомогою більшості доступних моделей повітряних термостатів важко, тому що їхня верхня температурна межа – 56,5°C. З одного боку, це на 4,5-5,5°C нижче, ніж у зазначеній методиці, з іншого – під час виконання процедури перенесення шматочків тканини з ємності в ємність потрібен деякий час, протягом якого термостатна камера сполучається з навколишнім середовищем. В результаті відбувається зниження температури, що призводить до застигання і навіть кристалізації поверхневих шарів парафіну.

Цих недоліків у значному ступені позбавлені водяні і, особливо, бактеріологічні термостати: їх конструкція передбачає додаткову функцію поступального (резисторного) підвищення температури на 20-30°C вище за верхню температурну межу термостатів на повітряній сорочці. Разом з тим, Р. Реасе [52] зазначає, що практично всі доступні моделі термостатів на водяній сорочці відрізняються високою вартістю, тому недоступні більшості гістологічних лабораторій. Автор пропонує оригінальний спосіб регуляції

температурного режиму в термостаті власної конструкції, що складається з бляшаного резервуара з вмонтованою зверху електричною лампочкою потужністю 60 Вт. Отримання задовільних результатів за допомогою такого обладнання, на наш погляд, є досить сумнівним. Можна досягти оптимальної температури парафінової суміші, регулюючи місцезнаходження джерела тепла, проте жодна зміна його положення не дозволяє досягти однакових температурних показників у різних ділянках парафінового резервуара. Звідси випливає, що швидкість і, якість просочування парафіном будуть різними.

З метою усунення цих недоліків нами було запропоновано спрощену та ефективну конструкцію водяного термостату (рис. 1.6.1.1).

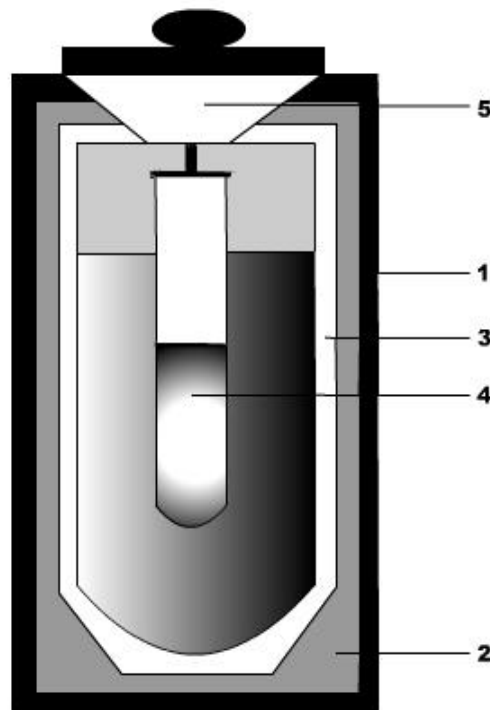


Рис. 1.6.1.1 – Водяний термостат.

1 – дюралюмінієвий кожух;

2 – тришаровий ізолятор (сорочка);

3 – судина Дьюара з водою;

4 – тримач кювети;

5 – кювета з парафіновою (парафін-целоїдіною) сумішшю;

Примітка. Нагрівач води, термореле та термометр у конструкцію термостата не входять.

Підігрів води для термостата здійснюється за допомогою будь-якого нагрівального приладу. Для швидкого підігріву ми рекомендуємо використовувати простий пристрій, що діє за принципом п'єзоелектричного нагрівача Шюллера-Григоровича (рис. 1.6.1.2).

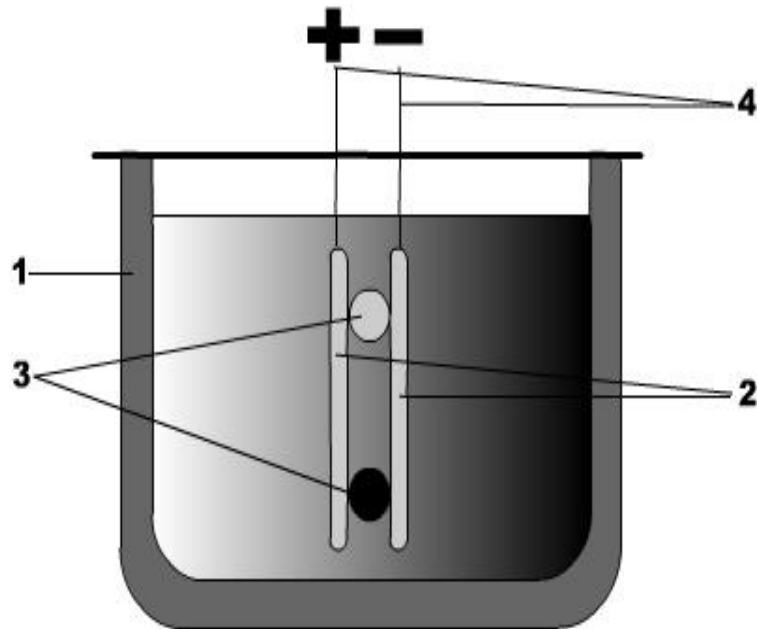


Рис. 1.6.1.2 – Схема нагрівального пристрою

- 1 – ємність із водою;
- 2 – сталеві пластини;
- 3 – стабілізовані прокладки;
- 4 – електричний провід.

Нагрівальні пластини (5,0x4,0x0,5 мм), вироблені з нержавіючої сталі марки «16 ХНМА» мають високий показник електропровідності і дозволяють нагріти 500,0 мл води до температури 80°C менш ніж за одну хвилину; після досягнення зазначеної температурної межі електричний ланцюг розмикається за допомогою вбудованого термореле від гістологічного автомата «Technicon-2» (Австрія).

Витрата електроенергії становить 380,0 Вт, що у 1500-1800 разів менше, ніж у відомих аналогічних марок лабораторних термостатів.

Принцип дії водяного термостата (див. рис. 1.29) досить простий: в судину Дьюара (3) поміщається вода, попередньо нагріта до 80-82°C і доведена до температури 60-62°C шляхом повільного охолодження або додавання холодної води. Потім у судину Дьюара (3) поміщається кювета (5) з попередньо розігрітою заливальною сумішшю і гістологічними об'єктами, що знаходяться у ній. Суміш повинна бути попередньо розплавлена на водяній бані при 70-75°C. Під час розміщення кювети (5) в судині Дьюара (3) необхідно простежити, щоб рівень води був на 1,0-1,5 см нижчим за її горловину. Судина Дьюара (3) і тришаровий ізолятор (2), розташований між ним та дюралюмінієвим кожухом (1), забезпечують постійну температуру всередині камери протягом 4 годин. Зміна порцій суміші заливки здійснюється швидко – в цей час втрати тепла як в кюветі (5), так і всередині термостата мізерні. Гістологічні об'єкти можуть розташовуватися у кюветі (5) вільно або, для зручності вилучення, можуть бути нанизані на тонкий мідний дріт.

Переваги цієї моделі термостата полягають у наступному:

- енергозбереження: під час нагрівання 0,5 л води витрачається 54 Вт електричної енергії;
- однієї зміни води достатньо для проведення восьми операцій заливання або чотирьох повних технологічних циклів;
- малі габарити (12x12x30 см);
- невелика маса (з водою – до 0,95 кг);
- можливість застосування в польових умовах.

Тривале збереження тепла в термостаті здійснюється як за допомогою судини Дьюара, так і завдяки наявності ізолятора, вибір якого ґрунтувався на синергізмі властивостей теплопровідності деяких конструкційних матеріалів (табл. 1.6.1.1).

Таблиця 1.6.1.1 – Різні типи ізоляторів та їх ефективність*

Тип ізолятора	Компонент	Товщина шару, см	Час зниження температури на 2°C, хв
Монокомпонент ний	повітря	3,0	40
	подрібнений азбест (ПА)	3,0	110
	полотно силіконізоване (ПС)	3,0	200
	соснова крихта (СК)	3,0	200
	крихта ялівця (КЯ)	3,0	145
	томаракова крихта (ТК)	3,0	165
Бікомпонент ний	ПА+ПС	1,5+1,5	310
	ПА+СК	1,5+1,5	250
	ПА+КЯ	1,5+1,5	255
	ПА+ТК	1,5+1,5	275
	ПС+СК	1,5+1,5	340
	ПС+КЯ	1,5+1,5	345
	ПС+ТК	1,5+1,5	365
Трикомпонент ний	ПА+ПС+СК	1,0+1,0+1,0+	450
	ПА+ПС+КЯ	1,0+1,0+1,0	455
	ПА+ПС+ТК	1,0+1,0+1,0	475

Примітка. Вибір компонентів ізоляторів ґрунтується на низьких показниках теплопровідності.

Як свідчать дані таблиці, комбіновані ізолятори найкращі через різко виражений підсумовуючий ефект. Якщо врахувати, що місткість кювети термостата обмежена, а час парафін-целоїдинового заливання за М.С. Козієм [2] становить 110 хв. (див. табл. 1.11), доцільно рекомендувати варіанти, що

дозволяють працювати в інтервалі часу, що відповідає трьом технологічним циклам, тобто 330 хв. і більше (ПС+СК; ПС+МК; ПС+ТК; ІА+ПС+СК; ІА+ПС+МК; ІА+ПС+ТК). Експериментально доведено, що ізолятор, що складається з подрібненого азбесту (зовнішній шар); томаракової крихти (середній шар); полотна силіконізованого класу «х/ч» (внутрішній шар), відокремлених один від одного тонким полотном із льону, найбільш ефективний.

Необхідно відзначити, що запропонована конструкція поряд з перевагами має недолік, яким є обмежена місткість кювети. У такій ємності важко обробляти більше 7 шматочків тканини розміром 5х5х0,5 мм. Природно, у разі збільшення кількості оброблюваного матеріалу якість просочення парафіном дещо знижується. Таким чином, запропонована конструкція термостата дозволяє якісно заливати невеликі кількості матеріалу та не розрахована на виконання великих обсягів робіт.

У разі обробки великої кількості матеріалу на практиці застосовують гістологічні автомати (рис. 1.6.1.3).



А Б
Рис. 1.6.1.3 – Гістологічні автомати фірми «Leica» (Німеччина)

А – гістопроесор карусельного типу;

Б – закритий гістопроесор

Слід відзначити, що будь-який автоматичний пристрій забезпечує роботу згідно з заданими і при цьому жорстко фіксованими параметрами проводки та заливання в ущільнювальні середовища. З цього випливає, що при врахуванні різномірності оброблюваного матеріалу, слід очікувати неточності у зневодненні та просоченні ущільнювальним середовищем. У зв'язку з цим щодо автоматичної обробки кожного гістологічного об'єкта необхідний індивідуальний підхід, що дуже важко. Це є основою пошуку нестандартних та ефективних рішень у гістологічній техніці.

1.7 Модифікація методики ацетонового зневоднення

З метою усунення недоліків обробки матеріалу та підвищення якості гістологічних зрізів, нами була вдосконалена методика заливання тканин гідробіонтів та ембріонального матеріалу до парафіну (Козій М.С. [2]) на базі вже існуючого способу ацетонового зневоднення. У порівнянні з прототипом новий спосіб відрізняється тим, що товщина гістологічного об'єкта, що обробляється, зменшена в 4-7 разів (до 0,5-1,0 мм). Простежено залежність швидкості та ступеня зневоднення, а також якості заміщення парафіном від фіксованої товщини гістологічного об'єкта (табл. 1.7.1).

Таблиця 1.7.1 – Результати ацетонового зневоднення та заливання до парафіну гістологічних об'єктів з фіксованою товщиною

Технологічна операція	Тривалість режиму, хв			Характеристика ушкоджень гістологічного об'єкту в досліджуваних режимах		
	1	2	3	1	2	3
Товщина гістологічного об'єкту менше 0,5 мм						
Промивання	6	6	6	-	-	-
Перше зневоднення ацетоном	20	30	40	структури тканин зморщуються	структури тканин зморщуються	структури тканин зморщуються
Друге зневоднення ацетоном	10	20	30	структури тканин зморщуються	структури тканин зморщуються	структури тканин зморщуються

Продовження таблиці 1.7.1

Перше занурення у парафін	20	30	40	структури тканин зморщуються	структури тканин зморщуються	структури тканин зморщуються
Друге занурення у парафін	20	30	40	структури тканин зморщуються	структури тканин зморщуються	структури тканин зморщуються
Товщина гістологічного об'єкта 1,0-1,0 мм						
Промивання	6	6	6	-	-	-
Перше зневоднення ацетоном	20	30	40	менша ступінь зневоднення	ушкоджень не спостерігається	структури тканин зморщуються
Друге зневоднення ацетоном	10	20	30	зневоднення незадовільне	ушкоджень не спостерігається	структури тканин зморщуються
Перше занурення у парафін	20	30	40	парафін незадовільно заміщує ацетон	ушкоджень не спостерігається	структури тканин зморщуються
Друге занурення у парафін	20	30	40	парафін незадовільно заміщує ацетон	ушкоджень не спостерігається	структури тканин зморщуються
Товщина гістологічного об'єкта 2,0 мм і більше						
Промивання	6	6	6	-	-	-
Перше зневоднення ацетоном	20	30	40	менша ступінь зневоднення	менша ступінь зневоднення	менша ступінь зневоднення
Друге зневоднення ацетоном	10	20	30	зневоднення незадовільне	зневоднення незадовільне	зневоднення незадовільне
Перше занурення у парафін	20	30	40	парафін незадовільно заміщує ацетон	зневоднення незадовільне	зневоднення незадовільне
Друге занурення у парафін	20	30	40	парафін незадовільно заміщує ацетон	парафін незадовільно заміщує ацетон	парафін незадовільно заміщує ацетон

Примітка. В даному випадку немає необхідності у використанні інтермедіатора (проміжної ланки між парафіном та ацетоном), оскільки ацетон сам є розчинником парафіну.

Як свідчать дані таблиці, у разі зміни експозиції витримки об'єкта в ацетоні (режим №1) він менше зневоднюється і стає непридатним для подальшого просочення парафіном. Якщо ж зменшується експозиція витримки об'єкта в парафіні (режим №1), він стає крихтим і непридатним для виготовлення зрізів; відрізняється ушкодженням структур тканини.

Обробляти гістологічні об'єкти товщиною понад 2,0 мм вищезазначеним способом також недоцільно: за малий проміжок часу проведення через ацетон у них немає достатнього зневоднення і наступного заміщення парафіном.

Обробляти гістологічні об'єкти товщиною менше 0,5 мм також не рекомендується, оскільки проведення через ацетон і занурення у парафін дуже тонких шматочків викликає швидке зморщування тканини. Таким чином, найкраще обробляти гістологічні об'єкти товщиною 0,5-1,0 мм згідно з режимом №2.

Повний варіант гістологічної обробки тканин та отримання постійних мікропрепаратів представлений у наступній схемі:

Модифікована методика ацетонового зневоднення та техніка отримання постійних мікропрепаратів.

1 – Фіксація: 4-5% нейтральний формалін або рідина Буена (2-24 год.), 20-30 °С;

2 – Зневоднення: 1-й 100% ацетон, 20 хв.; 2-й 100% ацетон, 15 хв. при кімнатній температурі;

3 – Заливання у парафін: 1-а суміш (парафін (90%); восколіт (10%)) – 30 хв., 2-га суміш (парафін (90%); восколіт (10%)) , 20 хв., при 56,5°С;

4 – Охолодження: вода, 10 хв., при 10 – 15°С; формування блоків;

5 – Різання на мікротомі;

6 – Розправлення (дистильована вода, 42°C), наклейка та висушування зрізів;

7 – Депарафінізація: О-ксилол, 0,5-1,0 хв, при кімнатній температурі;

8 – Заміщення О-ксилолу: етанол (96-100%) 0,5-1,0 хв., при кімнатній температурі;

9 – Заміщення етанолу: вода при кімнатній температурі;

10 – Фарбування №1: гематоксилін Гейденгайна або Ерліха, 7 – 15 хв при кімнатній температурі;

11 – Промивання: водопровідна вода, 1,0 хв; додаткове підсинення (за потреби), 5% розчин нашатирного спирту, миттєво, при кімнатній температурі;

12 – Фарбування №2: 0,2-2,0% спиртові (водні) розчини еозину, фуксину, сафраніну, миттєво при кімнатній температурі;

13 – Диференціація: етанол (96-100%), при видаленні барвника, при кімнатній температурі;

14 – Дофарбовування (за потреби): реактив Цинзерлінгу, миттєво, при кімнатній температурі;

15 – Диференціація: ацетон (100%), 0,5 хв., при кімнатній температурі;

16 – Просвітлення: О-ксилол, 0,5 хв., за кімнатної температури;

17 – Заключення: канадський бальзам.

Порівняно з прототипом, пропонований спосіб має такі переваги:

- тривалість операцій зменшується у 8 разів;
- витрати реактивів зменшуються у 14 разів;
- спрощується процес гістологічної обробки.

Поряд із зазначеними перевагами спосіб має недоліки: він малопридатний для обробки гістологічних об'єктів, що містять щільну сполучну тканину (кістки, сухожилля, зв'язки) – під час різання на мікротомі вони легко розшаровуються.

Слід також зазначити, що застосування такого способу заливання щодо деяких типів тканин гідробіонтів не завжди давало позитивний результат: зрізи

паренхіматозних органів (печінка, селезінка) мали схожість з мозаїкою, складеною з великих фрагментів.

Найбільш істотним недоліком даного способу є також його малоприсадибність для просочення жовткових гранул парафіном.

Примітно також, що з блоків, отриманих згідно з вищезгаданою схемою, не можна отримати дуже тонкі (3,0 мкм і менше) зрізи без розривів та деформацій. З метою усунення існуючих недоліків та найбільш повної реалізації способу обробки тканин ембріонів нами була модифікована методика комбінованої (парафін-целоїдинової) заливки гістологічного матеріалу.

1.8 Модифікація методики комбінованого (парафін-целоїдинового) заливання

Одним із найкращих і результативних методів, що дозволяють підготувати тканини зародків до мікротомного різання є заливання в целоїдин, або колоїдну нітроклітковину ($[C_6H_7O_2(ONO_2)_3]_n$). Цей спосіб найменше з усіх відомих у гістологічній техніці порушує цілісність тканин: коефіцієнт стиснення на момент формування блоку складає всього 5,0-6,0% (Sims B. [56], Lison L. [44]), в той же час процес заливання в целоїдин тривалий: становить 7-8 діб. Зрізи, отримані з целоїдинових блоків, часто мають порівняно більшу товщину (15-25 мкм) і дуже важко розправляються. Твердження Lison L. [44] що стосується виконання на мікротомі тонких (5-6 мкм) зрізів певною мірою неточні: в цей час отримати такий результат неможливо внаслідок пружності жорсткого і сурогатного целоїдину, що випускається більшістю торгівельних марок. Під час роботи з сортами, з яких складається рентгено- та кіноплівка (випуску 1955-1970 р.р.), рекомендується тривалий час витримувати блоки з метою їх розм'якшення в 96% спирті. Целоїдин надзвичайно чутливий до жиру, який може залишатися в шматочках тканини навіть після хорошого зневоднення. Жир, розчиняючись у целоїдині, робить його каламутним (рис. 1.8.1).

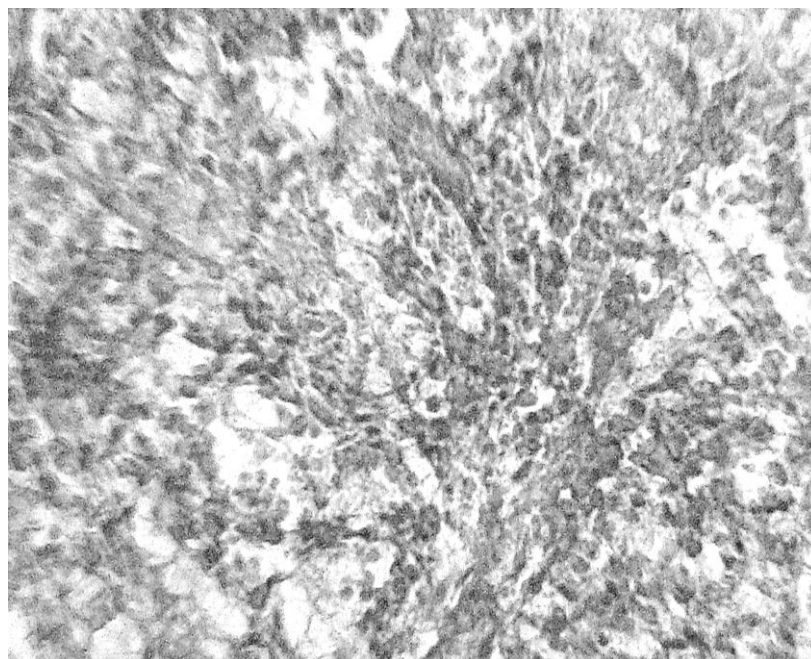


Рис. 1.8.1 – Фрагмент целоїдинового зрізу селезінки.

Гематоксилін Гейденгайна, еозин. 400х

Такий целоїдин залишається каламутним і після підсихання та ущільнення; він тоді ріжеться значно гірше (кришиться). З таких целоїдинових блоків важко виходять зрізи товщиною 20,0 мкм і більше, в той час як з хороших целоїдинових блоків можна отримати зрізи товщиною 10,0-12,0 мкм. Таким чином, целоїдинові зрізи дуже товсті і в більшості випадків можуть бути використані лише як оглядові. Враховуючи порівняно малі лінійні розміри клітин тканин гідробіонтів (2,0x3,0; 2,0x4,0 мкм), можна сказати, що навіть добре просвітлений і зафарбований целоїдиновий зріз важко досліджувати при великих збільшеннях мікроскопа.

У своїй практичній діяльності ми іноді використовуємо заливання недекальцинованих кісток у 2% ефірно-спиртовий розчин целоїдину за наступною схемою:

1. фіксація (зневоднення) в ацетоні, 3 год.;
2. суміш спирту з ефіром, 3-4 год.;
3. 2% ефірно-спиртовий розчин целоїдину, 6-7 год.;
4. упарювання розчину до 1/3 від початкового об'єму.

Після цього об'єкт висушують при кімнатній температурі до затвердіння. Різання такого блоку слід виконувати за допомогою ножа спеціального гарту: в цей час можна отримати зрізи товщиною 10,0-15,0 мкм. У процесі різання блок і зрізи необхідно змочувати 70%-м етанолом.

У літературі є дані про існування комбінованих методик заливання гістологічних об'єктів (парафін-целоїдиновий спосіб). Цей вид заливання поєднує переваги двох способів: парафінового та целоїдинового. Існують два основні варіанти заливання парафін-целоїдин:

I варіант (за Sims [56]):

1. фіксація матеріалу, 24 год.,
2. зневоднення в спиртах, 2-3 доби;
3. суміш спирту з ефіром, 3-6 год;
4. 2% ефірно-спиртовий розчин целоїдину, 1-2 доби;
5. хлороформ, 6-8 год.;
6. хлороформ-парафін, 2-3 год., при 37°C;
7. парафін №1, 1-2 год., при 54°C;
8. парафін №2, 1-2 год., при 54°C.

Загальний час технологічних операцій: 109-165 год.

II варіант (за Peterfi H. [53]):

1. фіксація матеріалу, 24 год.;
2. промивання матеріалу в проточній водопровідній воді, 12-24 год.;
3. 70% спирт, 2-24 год.;
4. 96% спирт, 2-6 год.;
5. абсолютний спирт, 2-6 год.;
6. просочення в целоїдиновому маслі (100,0 мл 2% ефірно-спиртового розчину целлоїдине і 100,0 мл касторового масла), 1-6 год.;
7. хлороформ №1, 15-30 хв.;
8. хлороформ №2, 15-30 хв.;

9. суміш парафіну з хлороформом (1:1), 6 год., при 37°C;

10. парафін №1, 15-30 хв., при 54°C;

11. парафін №2, 15-30 хв., при 54°C.

Загальний час технологічних операцій: 50-86 год.

Сутність цих методів полягає в тому, що після ретельного зневоднення, безпосередньо перед заливанням в парафін, тканина просочується розведеним (2%-м) спиртово-ефірним розчином целоїдину в суміші з маслом або без нього. На думку Н. Peterfi [53], цей спосіб забезпечує досить високу якість заливання – можна отримати зрізи товщиною 2,0-3,0 мкм, що особливо є цінним під час роботи з ембріональними тканинами.

Обидва методи є незначними варіаціями способу Апаті А. [13] і відрізняються від прототипу дещо меншим часом виконання.

Багаторазова апробація та детальний аналіз способу Апаті показав, що він не позбавлений недоліків. По-перше, тривале розміщення тканин у етиловому спирті, бензолі (ксилолі, толуолі) неминуче призводить до їх крихкості (Козій М.С. [6], Benstley R. R., Benstley S. A. [14]), по-друге, рекомендована до застосування суміш парафіну та бджолиного воску (95% і 5%) у ряді випадків малоефективна. Зрізи, отримані з таких блоків, не розправляються як слід у воді, часто закручуються і відокремлюються від предметного скла.

Ми вважаємо, що надмірна складчастість зрізів обумовлена високим вмістом у них целоїдину, а також додатковою присутністю у блоці 96% спирту, який додатково його розм'якшує.

Задовільного результату проникнення целоїдину в гістологічні об'єкти ми досягли при додатковому його розведенні сумішшю ефіру і 96% етилового спирту в 2 рази (до 1%). Це не відповідає режимам існуючих методик, проте ми вважаємо, що присутність у блоці меншої кількості целоїдину дозволяє підвищити ступінь лабільності заливального середовища і, отже, надалі полегшити процес різання блоку на мікротомі.

Як уже зазначалося, тривале перебування гістологічного матеріалу в спиртах дозволяє краще зберегти структури тканин, проте при цьому тканини, багаті на воду, стають крихкими, а жовток – твердим і розпорошеним. Модифікована нами методика ацетонового зневоднення лише у деяких випадках дозволяє на задовільному рівні зберегти цілісність досліджуваного матеріалу. З метою виключення помилок, пов'язаних з переущільненням матеріалу при зневодненні, як дегідратуючий агент ми запропонували використовувати метиловий спирт (CH_3OH). Він діє повільніше за ацетон, але набагато швидше етанолу проникає у тканини і викликає помірне затвердіння і розпилення жовтка. Метанол слід застосовувати лише 100%-м. Наш досвід показує, що досить використовувати дві зміни метанолу (див. табл. 1.2). Час знаходження гістологічних об'єктів у метанолі значно скорочується за рахунок підвищення температури спирту на 5°C , що сприяє кращому збереженню тканин.

У літературі є повідомлення (Langeron G. [42], Pease P. [52], Grobl A. [34] та ін.), що деякі природні (гвоздична, м'ятна, ориганова), а також синтетичні ефірні олії (вазелинова та ін.) сприяють просвітленню компонентів тканини, і, що особливо важливо, частковому пом'якшенню гістологічного матеріалу. Однак, не зовсім ясно, яким чином олії сприяють прискоренню дифузії целоїдину в тканину. Відсутні також літературні дані, що підтверджують необхідність підтримання постійної температури при просоченні тканин ефірно-целоїдиною сумішшю. Нами доведено, що з просоченням парафіном можна перевищити температурні режими операцій (на 5°C вище, ніж у класичних методиках) без шкоди для структури тканин. Такий підхід є доцільним, тому що при цьому дуже низька швидкість дифузії ефірно-целоїдинової суміші зростає в 2-2,5 рази.

Зазначено, що тривале перебування багатьох гістологічних об'єктів у бензолі (ксилолі, толуолі) є небажаним: одні тканини згодом стають крихкими і крихатими, інші – набувають небажаної твердості. Так, при витримюванні шматочка селезінки ($0,5 \times 0,5 \times 0,5$ см) в О-ксилолі протягом 1,5-2,0 год., об'єкт

набував значної твердості. Переуцільнена таким чином тканина в процесі різання здатна сильно пошкодити робочу поверхню сталевих пластин і край ножа мікротома.

Скоротити час перебування тканини в інтермедіаторі можна попередньо підвищивши температуру середовища на 5°C. Критерієм завершення операції заміщення метанолу є характерний вигляд об'єкта – він нагадує прозору пластмасу; якщо ж у ньому присутні білуваті включення (залишки води) – процедуру необхідно виконати повторно.

Таким чином, на основі вищесказаного можна зробити висновок, що відомі методи парафін-целоїдинового заливання мають резерви для удосконалення:

1. З метою швидкого проникнення та скорочення часу дії реактивів, необхідно зменшити товщину гістологічного об'єкта;
2. З метою прискорення та підвищення якості операції зневоднення застосовувати метиловий спирт;
3. З метою прискорення дифузії целоїдину в тканини та підвищення лабільності заливального середовища, масляно-целоїдинову суміш складати за прописом: «касторова олія+1% ефірно-спиртовий розчин целоїдину (1:1)»;
4. З метою покращення пластичних властивостей парафінової суміші як пластифікатор парафіну використовувати очищений ланолін (20-25%).

Особливості модифікованої методики парафіново-целоїдинового заливання представлені в таблиці 1.8.1.

Як свідчать дані таблиці, у разі зменшення експозиції витримки об'єкта в метанолі (варіант №1) він погано зневоднюється та стає не зовсім придатним для подальшої обробки. Під час підвищення температури середовища для заміщення на 10°C спостерігається невелике зморщування тканин.

Під час збільшення експозиції витримки об'єкта у метанолі (варіант № 3) за нормальної температури, зневоднення тканин недостатнє. У разі підвищення температури середовища для заміщення на 5 і 10°C спостерігаються різні ступені пошкодження тканин.

Таблиця 1.8.1 – Результати комбінованого заливання тканин ембріонів

Технолог. операція	Т, °С	Час обробки, хв			Характеристика тканин в досліджуваному режимі		
		варіант					
		1	2	3	1	2	3
І зневоднення	25	5	10	15	недостатнє зневоднення	недостатнє зневоднення	недостатнє зневоднення
ІІ зневоднення	25	5	10	15	недостатнє зневоднення	недостатнє зневоднення	недостатнє зневоднення
Заливання в масляний целоїдин	7	15	30	45	недостанє заміщення	недостанє заміщення	недостанє заміщення
Освітлення в О-ксилолі	25	10	15	20	недостанє заміщення	недостанє заміщення	недостанє заміщення
Заливання в 1-й парафін	56 – 57	15	25	35	недостанє заміщення	недостанє заміщення	недостанє заміщення
Заливання в 2-й парафін	56 – 57	10	20	30	недостанє заміщення	недостанє заміщення	недостанє заміщення
Другий температурний режим							
І зневоднення	30	5	10	15	недостатнє зневоднення	часткове зневоднення	розпилення жовтка
ІІ зневоднення	30	5	10	15	недостатнє зневоднення	повне зневоднення	затвердіння жовтка
Заливання в масляний целоїдин	42	15	30	45	недостанє заміщення	повне заміщення	повне заміщення
Освітлення в О-ксилолі	30	10	15	20	недостанє заміщення	повне заміщення	помірне стискання
Заливання в 1-й парафін	61 – 62	15	25	35	недостанє заміщення	повне заміщення	помірне стискання
Заливання в 2-й парафін	61 – 62	10	20	30	недостанє заміщення	повне заміщення	помірне стискання

Продовження таблиці 1.8.1

Третій температурний режим							
I зневоднення	30	5	10	15	помірне стискання, повне зневоднення	сильне зморщування, часткове зневоднення	сильне зморщування, часткове зневоднення
II зневоднення	35	5	10	15	помірне стискання, повне зневоднення	сильне зморщування, часткове зневоднення	сильне зморщування, повне зневоднення
Заливання в масляний целоїдин	47	15	30	45	повне заміщення	повне заміщення	повне заміщення
Освітлення в О-ксилолі	35	10	15	20	помірне стискання	сильне зморщування	сильне зморщування
Заливання в 1-й парафін	66 – 67	15	25	35	помірне стискання	сильне зморщування	сильне зморщування
Заливання в 2-й парафін	66 – 67	10	20	30	помірне стискання	сильне зморщування	сильне зморщування

У випадку зменшення експозиції наступної витримки тканин у целоїдиново-масляній суміші, О-ксилолі та двох парафінах (варіант №1) спостерігається низький ступінь взаємозаміщення. Під час підвищення температури на 10 °С тканини добре просочуються, але дещо стискаються.

У разі збільшення експозиції витримки тканин (варіант №3) поряд з гарним просоченням спостерігаються значні порушення гістологічної структури тканин, особливо у випадку підвищення температури. Обробка гістологічних об'єктів у варіанті №3 під час підвищення температури на 5°С небажана у відношенні до тканин, що містять велику кількість води та жовтка.

Обробка гістологічних об'єктів при підвищенні температури на 10°С недоцільна для усіх трьох варіантів експозиції внаслідок грубої дії термічного та хімічного фактора на цілісність тканин усіх типів, а також через можливість виникнення діагностичних помилок.

Таким чином, найбільш доцільним є оброблення тканини гідробіонтів згідно з режимом №2, при підвищенні температури середовищ для заміщення на 5°C.

Повний варіант гістологічної обробки тканин та отримання постійних мікропрепаратів представлений у наступній схемі:

**Модифікована методика комбінованого заливання та отримання
постійних мікропрепаратів тканин,
що містять велику кількість води.**

1 – Фіксація: 4-5% нейтральний формалін або рідина Буена (2-24 год.), 20-30°C;

2 – Зневоднення: 1-й 70% метанол, 10 хв.; 2-й 100% метанол, 10 хв., при 30°C;

3 – Заливання в масляний целоїдин: (ефірно-спиртовий целоїдин (1%), рицинова олія у співвідношенні 1:1), 30 хв., при 42°C;

4 – Інтермедіатор (освітлювач): О-ксилол, 15 хв., при 30°C;

5 – Заливання в парафін: 1-а суміш (парафін (85-90%); ланолін (10 – 15%)), 25 хв.; 2-га суміш (парафін (85-90%); ланолін(10-15%)), 20 хв., при 61-62°C;

6 – Охолодження: вода, 10 хв., 10-15°C; формування блоків;

7 – Різання на мікротомі;

8 – Розправлення (дистильована вода, при кімнатній температурі), наклеювання та висушування зрізів;

9 – Депарафінізація: О-ксилол, 0,5-1,0 хв, при кімнатній температурі;

10 – Заміщення О-ксилолу: етанол (96-100%) 0,5-1,0 хв., при кімнатній температурі;

11 – Заміщення етанолу: вода при кімнатній температурі;

12 – Фарбування №1: гематоксилін Гейденгайна або Ерліха, 7-15 хв. при кімнатній температурі;

13 – Промивання: водопровідна вода, 1,0 хв.; додаткове підсинення (за потреби), 5% розчин нашатирного спирту, миттєво, при кімнатній температурі;

14 – Фарбування №2: 0,2-2,0% спиртові (водні) розчини еозину, фуксину, сафраніну; миттєво при кімнатній температурі;

15 – Диференціація: етанол (96 – 100%), при видаленні барвника, за кімнатної температури;

16 – Фарбування (за потреби): реактив Цинзерлінгу, миттєво, при кімнатній температурі;

17 – Диференціювання: ацетон (100%), 0,5 хв., за кімнатної температури;

18 – Освітлення: О-ксилол, 0,5 хв при кімнатній температурі;

19 – Заключення: канадський бальзам.

Порівняно з прототипом новий спосіб має такі переваги:

– зменшується витрата спирту в 11 разів, целоїдину – у 2 рази, О-ксилолу – у 10 разів;

– спрощується процес гістологічної обробки тканин та зменшується час технологічних операцій (у 22 рази);

– економія від застосування методу в розрахунку на 100 препаратів становить 729,3 грн.

Примітно, що вищезазначена методика дозволяє зробити заливання тканин швидше і не менш якісно, ніж за допомогою дорогих мікрохвильових гістопроекторів «MILESTONE HISTOS 3/5» (European Patent EP 0822403 29 07., 2018; US Patent 944), «MILESTONE URM» (European Patent 1605243., 2016; US Patent 7075045., 2016).

1.9 Зберігання гістологічних об'єктів

Ефективність того чи іншого методу характеризує низку показників:

1. використання недорогих та доступних реактивів;
2. економія часу;
3. універсальність стосовно різних типів тканин;

4. забезпечення оптимальної безпеки досліджуваного об'єкту після усіх технологічних операцій.

Збереження тканинних структур визначається як відсутністю деформацій, так і коефіцієнтом стиснення, тобто зменшенням початкового об'єму гістологічного об'єкту в процесі обробки. Чим він нижчий, тим ефективніша методика стосовно певного об'єкту (табл. 1.9.1).

Таблиця 1.9.1 – Зберігання тканин після ацетонового зневоднення з наступним заливанням у парафін*

№ з/п	Орган системи	Ступінь стиснення			
		фіксація**	зневоднення	заливання	всього
Нервова система					
1	головний мозок	2	6	9	17
2	спинний мозок	2	6	9	17
3	нервовий вузол	2	6	9	17
Кровоносна система					
4	серце	1	3	6	10
5	артерія	-	2	6	8
6	вена	1	1	7	9
7	селезінка	3	6	11	20
8	лімфоїдна тканина	3	7	11	21
9	тимус	3	6	11	20
Система органів дихання					
10	легеня	2	3	7	12
11	трахея	1	3	6	10
12	бронх	-	2	3	5

Продовження таблиці 1.9.1

Травна система					
13	глотка	1	7	9	17
14	стравохід	1	4	8	13
15	шлунок	1	4	7	12
16	тонкий кишечник	1	5	8	13
17	товстий кишечник	1	5	8	13
18	прямий кишечник	1	5	8	13
19	слинна залоза	-	2	3	5
20	печінка	2	7	9	18
21	жовчний міхур	-	3	6	9
22	підшлункова залоза	1	7	7	15
Видільна система					
23	нирка	2	8	10	20
24	сечовий міхур	1	6	6	15
Опорно-рухова система					
25	кістка	-	2	2	4
26	хрящ	-	2	4	6
27	м'язи	1	2	8	11
Покриви тіла					
28	шкіра	1	3	5	9
Система органів відтворення					
29	сім'яники	3	6	13	22
30	яєчник	3	5	12	20
Середнє значення		1,3	4,5	7,6	13,4

Примітка: *Дані похідних шкіри та сенсорних органів у таблиці відсутні;

** Фіксація проводилася сумішшю Буена у нашій модифікації.

Як видно з таблиці, фіксація сумішшю Буена викликає невелике стискання об'єктів, але набагато сильніше їх стискають ацетон і парафін (на 6,3 і 3,2% відповідно). Після багаторазово випробувавши різних прописів ацетонового зневоднення, ми дійшли висновку, що і середні значення ступеню стиснення об'єктів перевищують отримані нами на 21,6% (35,0%) і 16,6 (30,0%). Така

різниця обумовлена насамперед значним скороченням часу впливу хімічного та фізичного (температурного) фактора на шматочки тканин, що мають фіксовану товщину (див. табл. 1.10).

Найбільш суттєві показники збереження об'єктів були отримані під час використання модифікованої нами методики Апаті (табл. 1.9.2).

Таблиця 1.9.2 – Зберігання тканин після парафіново-целоїдинового заливання *

№ з/п	Орган системи	Ступінь стиснення			
		фіксація**	зневоднен ня***	просочування целоїдино- масляною сумішшю	Освітлення в О-ксилолі
Нервова система					
1	головний мозок	2	4	-	2
2	спинний мозок	2	4	-	2
3	нервовий вузол	2	4	-	2
Кровоносна система					
4	серце	1	2	-	1
5	артерія	-	2	-	1
6	вена	1	2	-	2
7	селезінка	3	5	-	2
8	лімфоїдна тканина	3	5	-	3
9	тимус	3	5	-	3
Система органів дихання					
10	легеня	2	3	-	1
11	трахея	1	2	-	1
12	бронх	-	1	-	-

Продовження таблиці 1.9.2

Травна система					
13	глотка	1	5	-	2
14	стравохід	1	3	-	1
15	шлунок	1	2	-	1
16	тонкий кишечник	1	3	-	1
17	товстий кишечник	1	3	-	1
18	прямий кишечник	1	3	-	1
19	слинна залоза	-	1	-	-
20	печінка	2	5	-	2
21	жовчний міхур	-	2	-	1
22	підшлункова залоза	1	4	-	2
Видільна система					
23	нирка	2	5	-	3
24	сечовий міхур	1	4	-	2
Опорно-рухова система					
25	кістка	-	1	-	-
26	хрящ	-	1	-	-
27	м'язи	1	3	-	1
Покриви тіла					
28	шкіра	1	3	-	1
Система органів розмноження					
29	сім'яники	3	6	-	2
30	яєчник	3	5	-	2
Середнє значення		1,3	3,3	-	1,4

Примітка: *Дані похідних шкіри та сенсорних органів чуття у таблиці відсутні;

** Фіксація проводилася сумішшю Буена у нашій модифікації;

*** Зневоднення проводилося у метанолі.

Зневоднення об'єктів з фіксованою товщиною у двох змінах метилового спирту відбувається на 20 і 10 хвилин швидше та набагато якісніше, ніж у безводному ацетоні (див. табл. 1.11, 1.12): показник ступеня стиснення тканин на 4,3% також є нижчим.

Згідно з даними таблиці 1.12, під час заливання до парафіну тканини стискаються в середньому на 4,5%. Попереднє просочування об'єктів целоїдино-масляною сумішшю надає їм додаткової міцності: навіть сильно розведені розчини целоїдину під час подальшого ущільнення мають досить велику пружність – це на 1,2% захищає тканину від стискання в двох змінах парафіну. Таким чином, нетривалий час впливу температурного фактора (45 хв. знаходження у розплавленому парафіні) та додатково надана тканині міцність та термостійкість дозволяють зменшити середнє значення ступеня стиснення об'єктів порівняно з ацетоновим зневодненням на 4,1%.

Таким чином, можна зробити висновок, що модифікована методика комбінованого заливання тканин у парафін-целоїдин є більш результативною у порівнянні з відомими способами заливання: класичними методиками заливання в парафін, методиками заливання в парафін-целоїдин, а також методиками ацетонового зневоднення. У зв'язку з цим є підстава рекомендувати цю модифікацію спеціально для заливання ембріональних тканин.

1.10 Формування парафінових (парафіново-целоїдинових) блоків

Перш ніж приступити до виготовлення зрізів на мікротомі, необхідно сформувати парафінові блоки із заключеним матеріалом. У літературі описані численні способи, за допомогою яких можна їх досить якісно сформувати. Сутність одного з них полягає в тому, що під майбутній блок оператором виготовляється форма з пергаментного паперу. В іншому випадку, на скло, попередньо змочене гліцерином, кладуть два свинцеві або мідні вуглики внутрішніми боками один до одного, проміжок між якими точно повторює форму блока.

За наявності дрібних гістологічних об'єктів, застосування цих способів не дає позитивного результату: блоки зручніше виготовляти методом закапування, введеним в гістологічну практику Navashin та згодом удосконаленим нами (Козій М.С. [6]). Цей метод дозволяє дуже точно монтувати на одному блоці до

п'яти зразків і, відповідно, отримувати на мікротомі числені зрізи. «Метод закапування» включає наступні операції:

1. З добре профільтрованого розплавленого парафіну виготовляють палички шириною близько 1,0 см, товщиною 5,0-8,0 мм і довжиною близько 15,0 см. Для цього рідкий парафін наливають у довгі вузькі паперові коробочки і охолоджують. За іншого способу парафін наливають в одну велику широку коробку, дають йому частково затвердіти і нарізають гострим скальпелем палички потрібного розміру.

2. На полум'ї газового або спиртового пальника нагрівають верхню поверхню блокуотримувача і, обережно підігріваячи кінець парафінової палички, краплю за краплею наносять парафін на нагріту поверхню доти, доки не утворюється шар парафіну висотою 2,0-3,0 мм («парафіновий майданчик»).

3. Нагрітим на спиртовці гістологічним зондом по одному виплавляють об'єкти із заливального парафіну в потрібній кількості та переносять їх на предметне скло. Можна зробити інакше: розплавити у фарфоровій чашці весь заливальний парафін, потім підігрітим зондом дістати потрібні об'єкти і розкласти їх на предметному склі.

4. Об'єктам надають бажану форму, підрізаючи їх з боку зрізу скальпелем або лезом безпечної бритви.

5. На парафіновому шарі, створеному раніше, нагрітим зондом розплавляють центральну ділянку, а потім іншим (холодним) кінцем цього ж зонда переносять і ставлять вертикально, близько один до одного заздалегідь підготовлені зразки.

6. Нагрітим зондом розплавляють парафін навколо об'єктів, потім обережно капають на них розплавленим парафіном, який стікає з кінчика парафінової палички, що нагрівається на полум'ї спиртовки. Необхідно робити так, щоб наступні краплі не скочувалися з парафінового підвищення, що утворюється навколо об'єктів і ще не встигло застигнути. Перед нанесенням кожної наступної краплі бажано дещо сповільнитися, щоб на парафіновому підвищенні виникла тонка плівочка і під час з'єднання краплі з підвищенням

трохи підтримати її кінчиком парафінової палички. Поступово об'єкти мають опинитися усередині високої прозорої парафінової краплі.

7. Після затвердіння парафіну блоки із закапаними об'єктами опускають у холодну воду, щоб усунути небажану кристалізацію парафіну.

8. Надають блоку форму правильного паралелепіпеда або усіченої чотиригранної піраміди, що наближається формою до паралелепіпеда. Для цього спочатку лезом безпечної бритви або гострим скальпелем поступово зрізають (зістругують) верхівку блоку паралельно підставці таким чином, щоб над кінчиками об'єктів залишався шар парафіну товщиною близько 1,0 мм і в цей час їх можна було нечітко бачити. Потім поступово обрізають надлишок парафіну з боків блоку, одночасно надаючи йому форму паралелепіпеда з гранями, паралельними граням блоку. В результаті обрізання блоку навколо об'єкта повинен залишатися шар парафіну завтовшки близько 1,5-2,0 мм. На цьому закінчують обробку блоку та приступають до виготовлення зрізів на мікротомі.

Варіант цього способу, спеціально розроблений нами, також дуже зручний для орієнтації шматочків тканини, що мають складні пропорції:

1. Попередньо підготувати чашку з розплавленим парафіном (його температура повинна досягати 65-70°C);

2. Опустити дно чашки в широкогорлу ємність із холодною водою на 2-3 секунди;

3. Перемістити в чашку шматочки тканини і зорієнтувати їх на дні (це виконується легко, оскільки охолоджений знизу парафін добре фіксує об'єкти в заданому положенні);

4. Після застигання верхніх шарів парафіну занурити чашку в ємність із холодною водою.

Через 1,5-2,0 хв. На поверхні можна спостерігати дві парафінові фракції: парафін, що застигнув, розташовується на периферії, теплий – усередині («світла сфера»). Згодом сфера звужується та зникає. Це критерій повного

застигання парафіну: злегка підігрів дно чашки, його можна витягти для подальшого формування блоків.

Насправді іноді буває необхідність виконання спеціальних блоків виготовлення поперечних зрізів дрібних трубчастих структур (ділянки кишечника і кровоносних судин). У даному випадку як фіксатори об'єктів рекомендовано використовувати звичайну шпильку. З метою правильної та більш точної орієнтації об'єктів ми застосовуємо наступний прийом:

1. Після відбору матеріалу зразки в бажаному порядку насадити послідовно на тонкий Т-подібний ніхромовий або мідний дріт;
2. Встановити «заготівлю» у паперовій формі;
3. Залити «заготівлю» у паперовій формі розплавленим парафіном (рис. 1.10.1).

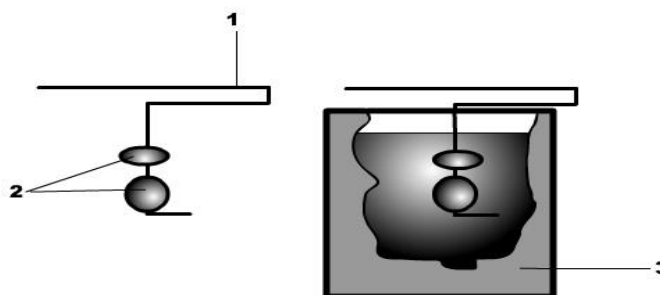


Рис. 1.10.1 – Техніка виконання спеціальних блоків для виготовлення поперечних зрізів дрібних трубчастих структур.

1 – Т-подібний дріт; 2 – гістологічні об'єкти; 3 – встановлення «заготівлі» у паперовій формі, що наповненій розплавленим парафіном.

Після охолодження парафінового блоку його спочатку акуратно обрізають знизу, відгинають нижній кінець дроту, потім легким обертальним рухом дріт видаляють.

Верхню нерівну поверхню, яка надалі стає нижньою частиною блоку, акуратно обрізають. Потім блок обрізають з чотирьох боків так, щоб він набув форми усіченої піраміди. Якщо хочуть отримати стрічку послідовних зрізів, з чотирьох кутів блоку необхідно зрізати вузькі трикутні клини – в результаті зрізи будуть відокремлені один від одного V-подібними вирізами.

У літературі є нечисленні повідомлення, що вказують на необхідність виконання певної зміни поперечного перерізу при формуванні блоку; наголошено, що доцільно виготовляти блок у формі прямокутника (рис. 1.10.2).

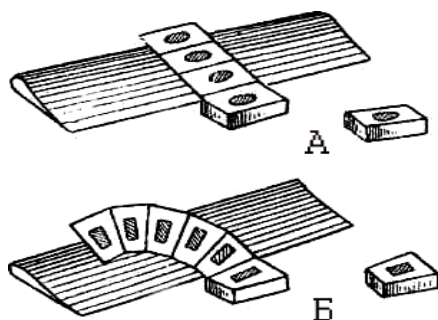


Рис. 1.10.2 – Вплив форми блоку на форму отриманих парафінових зрізів.

А – парафінова стрічка; Б – зрізи неправильної конфігурації.

Експериментально доведено, що форма блоку значною мірою впливає на якість різання і відповідно на цілісність зрізу. Результати численних дослідів показують, що існує залежність розміру краю, або товщини середовища ущільнювача від величини залитого в неї шматочка тканини. Встановлено, що перед різкою на мікротомі блок у поперечному перерізі повинен нагадувати квадрат або коло (рідше ромб або еліпс) (рис. 1.10.3).

Перевага такої конфігурації перерізу блоку пояснюється тим, що у разі вибору інших його форм можливі негативні наслідки впливу ударної сили мікротомного ножа на блок у вигляді виникнення в ньому пружних деформацій різного ступеня.

Край ущільнювального середовища навколо шматочка тканини не повинен перевищувати 2,0 мм. З цим твердженням можна погодитися лише у тому випадку, якщо його розмір сягає близько 5,0-8,0 мм. Якщо шматочок тканини малий, доцільно довести розмір кожного боку (або діаметра) блоку до 10,0-12,0 мм: при цьому деформація та усунення гістологічного об'єкта під час різання на мікротомі зводяться до мінімуму. Цей прийом особливо корисний під час формування блоків, що містять пухкі тканини.

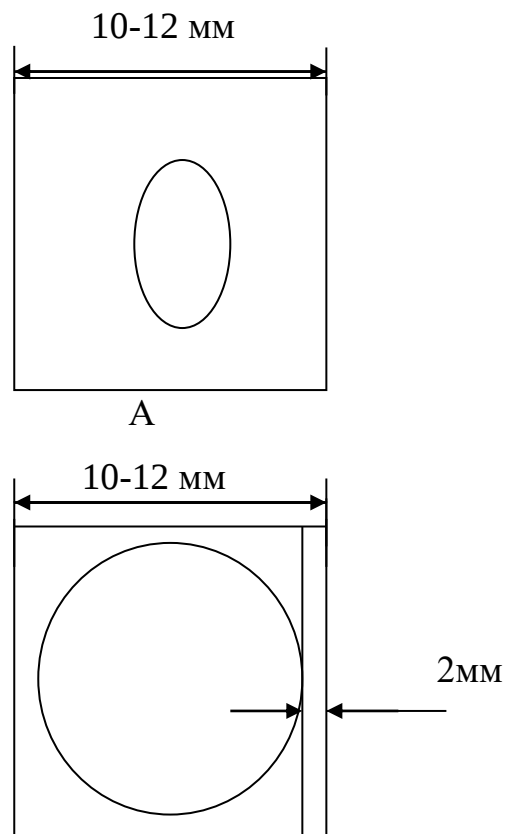


Рис. 1.10.3 – Параметри формування парафінового
(парафін-целоїдинового) блоку

А – блок із маленьким шматочком тканини;

Б – блок із великим шматочком тканини

У процесі різання блоку, зрізи в парафіновій стрічці практично не деформуються. Насправді це твердження не є зовсім коректним: доведено, що конфігурація отриманих зрізів тканин значно відрізняється від початкової конфігурації блоку. Всупереч існуючій думці, згідно з яким удар леза ножа повинен припадати прямо по всій довжині блоку, ми вважаємо, що блок доцільно переорієнтувати щодо ріжучої кромки на 45° (рис. 1.10.4).

Проаналізувавши результати способу «Б», можна зробити висновок:

1. Мала, поступово зростаюча площа зіткнення ножа і блоку, зрештою відповідає невисокій мірі деформації зрізу;
2. Напрямки векторних сил дії та протидії в блоці підпорядковуються «Закону парабол», внаслідок чого напрямки векторних сил дії та протидії перетинаються, або «фокусуються» всередині блоку, тобто взаємопогашуються (рис. 1.10.6).

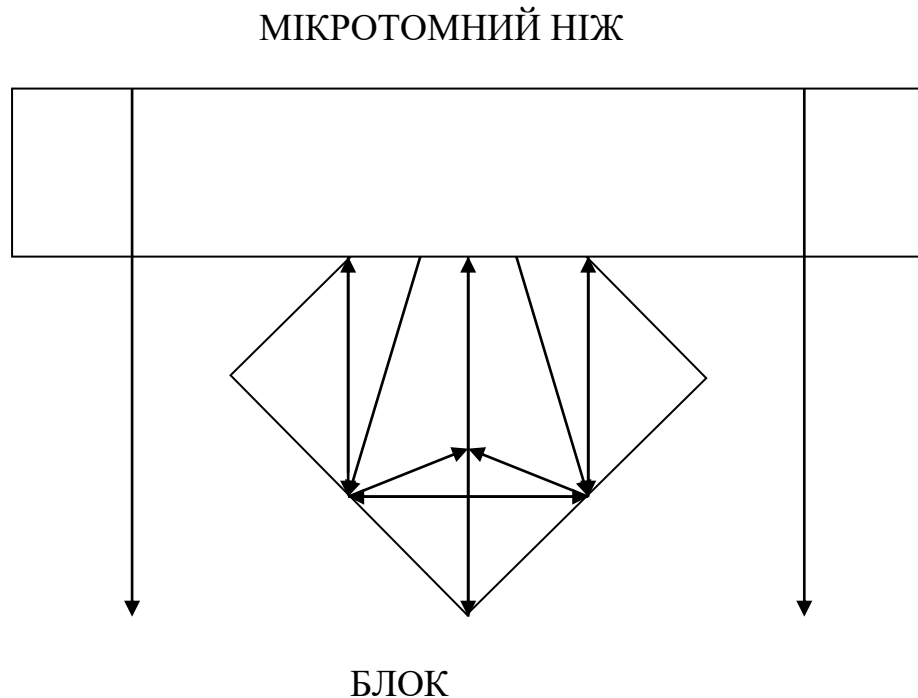
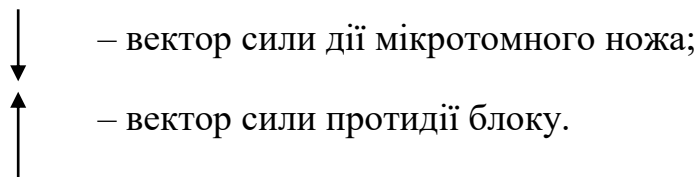


Рис. 1.10.6 – Напрямки векторів сил при поступово зростаючій довжині дотику мікротомного ножа та блоку



Таким чином, квадратна форма блоків, за їхньої «крайової» орієнтації в процесі різання на мікротомі дозволяє краще зберегти зріз, і, відповідно, надалі отримати достовірну гістологічну картину.

1.11 Приготування зрізів

1.11.1 Характеристика мікромів: можливі шляхи удосконалення

У повсякденній практиці для різання парафінових (парафін-целоїдинових) блоків найчастіше використовують санні або салазкові мікротом (рис. 1.11.1.1).



Рис. 1.11.1.1 – Салазковий мікромом «Leica» (Німеччина)

Санний мікромом «МС-2» харківського виробничого об'єднання «Медточприлад», призначений для різання парафінових, парафіново-целоїдинових та целоїдинових блоків, є аналогом зарубіжних моделей і також складається з масивної станини, механізму мікроподачі, механізму підйому об'єктоутримувача і ножових санок (рис. 1.11.1.2).

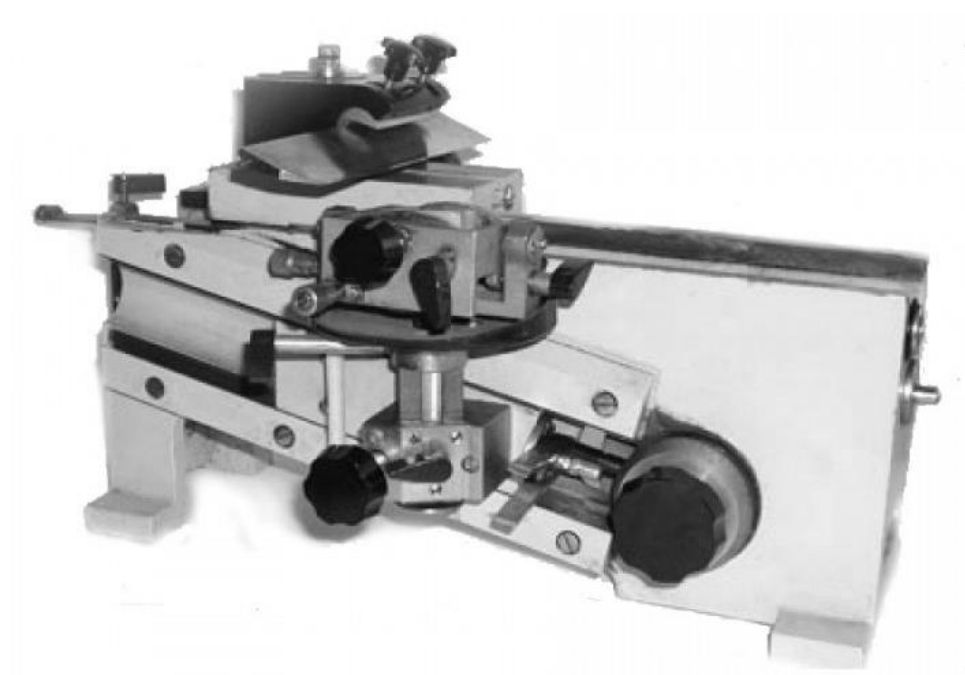


Рис. 1.11.1.2 – Салазковий мікромом «МС-2» (Україна)

Робочий діапазон приладу від 4,0 до 60,0 мкм.

Справність та хороше юстування вузлів мікромомів є гарантантами якісного різання. Як показує досвід більшості гістологічних лабораторій, недоліки в роботі відсутні лише у обладнання з відносно невеликим терміном експлуатації: одержання дуже тонких зрізів на мікротомах застарілих моделей важко. По-перше, незважаючи на досить високий ступінь точності роботи механізму мікроподачі, наявність множинних вузлів підйому, кріплення та орієнтації блокуотримувача не можна досягти жорсткої фіксації колодки з блоком. По-друге, часто зношеність полозів станини, вибоїни і навіть невелика їх забрудненість призводять до різного роду вертикальних вібрацій, що значно погіршує якість зрізів. По-третє, навіть при нормальній роботі приладу, досить важко домогтися отримання зрізів мінімальної товщини, посилаючись на показання вбудованого стрічкового мікрон-ноніуса: його показання та дані дискового лімба часто не збігаються (що є свідченням неточності заводського складання). Ці та інші недоліки зустрічаються в роботі санкових мікромомів найчастіше і є причиною не тільки низької якості зрізів, але і псування блоків.

Цих недоліків значною мірою позбавлені сучасних моделей саних мікротомів. Робочий діапазон приладів від 1,0 до 60,0 мк.

Ротаційні мікротоми спеціально призначені для отримання тонких парафінових зрізів. (рис. 1.11.1.3).



Рис. 1.11.1.3 – Ротаційний мікротом «Leica» (Німеччина)

Існують також комбіновані варіанти, що поєднують елементи ротаційного та салазкового мікротомів. Ці та аналогічні вітчизняні моделі у складі конструкції мають дуже точні механізми подачі транспортної стрічки, транспортера та приводу механізму мікроподачі. Істотним недоліком цього обладнання є великі труднощі, пов'язані з налагодженням та сервісним обслуговуванням окремих вузлів та їх частин. Висока вартість ротаційних мікротомів, а також порівняно невеликий термін їх експлуатації є причиною того, що вони не часто зустрічаються у гістологічних лабораторіях.

Під час забезпечення якості заливки матеріалу, для отримання досить тонких зрізів з успіхом можна використовувати круговий мікротом моделі «Кріо-Х» харківського виробничого об'єднання «Медточприлад» (рис. 1.11.1.4).

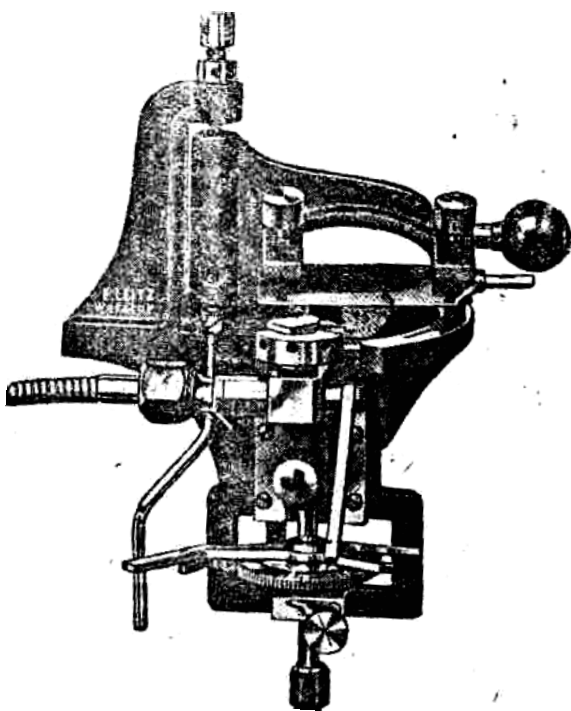


Рис. 1.11.1.4 – Коловий заморожуючий мікромом «Кріо-Х» (Україна)

Ця модель, створена на базі автоматичного ріжучого блоку кріостата Reichert-26 MC (Австрія), має хороші технічні характеристики і відрізняється від аналогів цього класу наступним:

1. Не має ножових санок;
2. Не має об'єктоутримувача;
3. Ножетримач встановлений на масивній вертикальній осі, з'єднаний з корпусом за допомогою двох циліндричних блоків і обертається на 90-100°;
4. Механізм мікроподачі та гніздо полозків повзунка столика з'єднані за допомогою «плаваючого» напрямника;
5. Гвинт механізму мікроподачі розташований вертикально щодо корпусу станини;
6. Подача блоку вертикальна:
 - а) точна: за допомогою пружинного дискового грейфера, мікрометричного гвинта та його дискового зубчастого напрямника;
 - б) груба: за допомогою автономного обертання мікрометричної ручки гвинта;

7. Установка робочого стану мікротома здійснюється за допомогою гайки площинного ноніуса-притискача.

У приладі застосовується стандартний мікрометричний гвинт, виконаний із міцної сталі (марка «18 ХНМА») та має крок різьблення 0,5 мм. Це означає, що під час автоматичного поштовху осі ножетримача зуб пружинного рейфера обертає зубчастий напрямник гвинта, що надає йому повороту на 7° ; при цьому повзунок столика піднімається вгору на 5,0 мкм.

З метою підвищення експлуатаційних якостей приладу та отримання якісних зрізів, нами були внесені до його конструкції наступні зміни:

1. Циліндричні блоки вертикальної осі ножетримача замінені на шарнірні, виготовлені з найбільш стійкого конструкційного матеріалу (рис. 1.11.1.5).

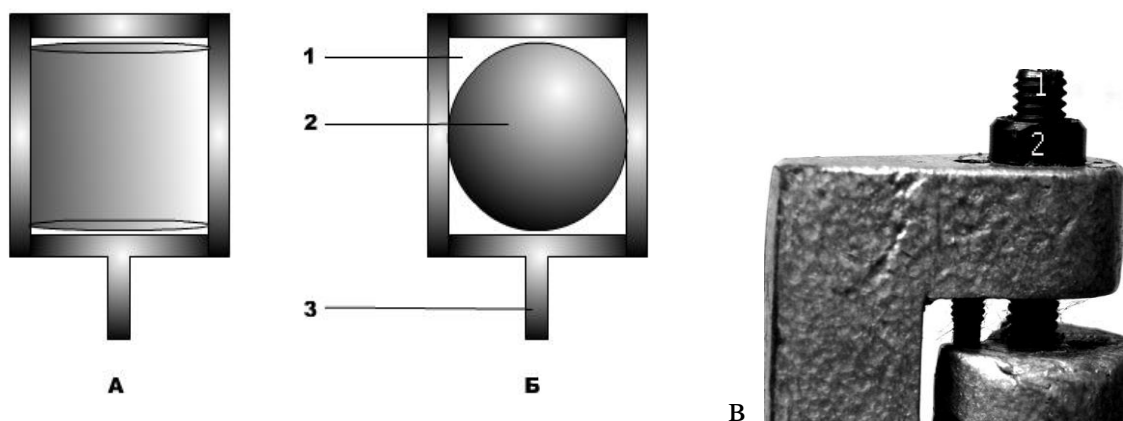


Рис. 1.11.1.5 – Шарнірний блок вертикальної осі ножетримача
кругового мікротому «Кріо-Х»

А – первинний варіант;

Б – удосконалений варіант

1 – гніздо;

2 – шарнір;

3 – вертикальна вісь ножетримача

В – зовнішній вигляд

1 – вертикальна вісь ножотримача;

2 – гніздо з шарніром

2. Гвинт механізму мікроподачі, а також його вертикальна несуча гайка замінені на:

а) аналогічні, виготовлені з найбільш стійкого конструкційного матеріалу (марка сталі «40 ХНМА»);

б) мають менші величини кроків різьблення гвинта та великі зовнішні та внутрішні діаметри гайки (гвинт: крок різьблення – 0,25 мм, зовнішній діаметр – 7,0 мм; несуча гайка – внутрішній діаметр 6,5 мм) (рис.1.11.1.6).

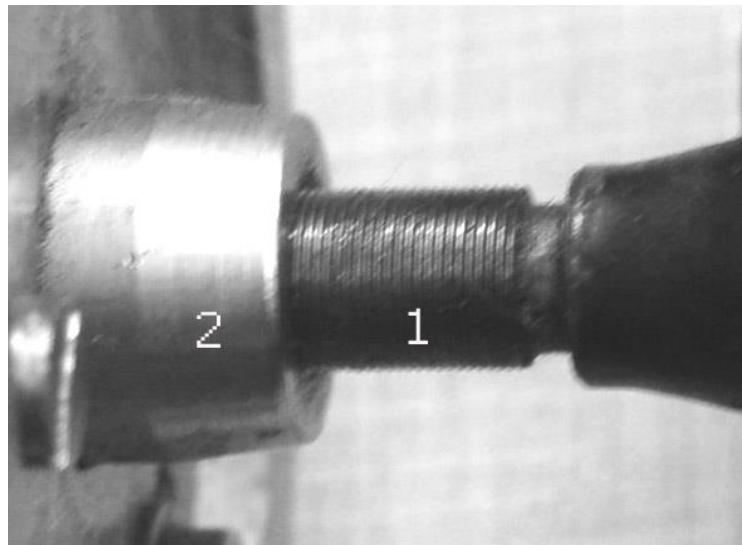


Рис. 1.11.1.6 – Удосконалений механізм мікроподачі кругового мікротому «Кріо-Х»

1 – мікрометричний гвинт;

2 – вертикальна несуча гайка

3. Дисковий зубчастий напрямник гвинта замінений на аналогічний, з кількістю зубів 450 од., що у 1,5 разу перевищує їх кількість у прототипу (рис. 1.11.1.7);

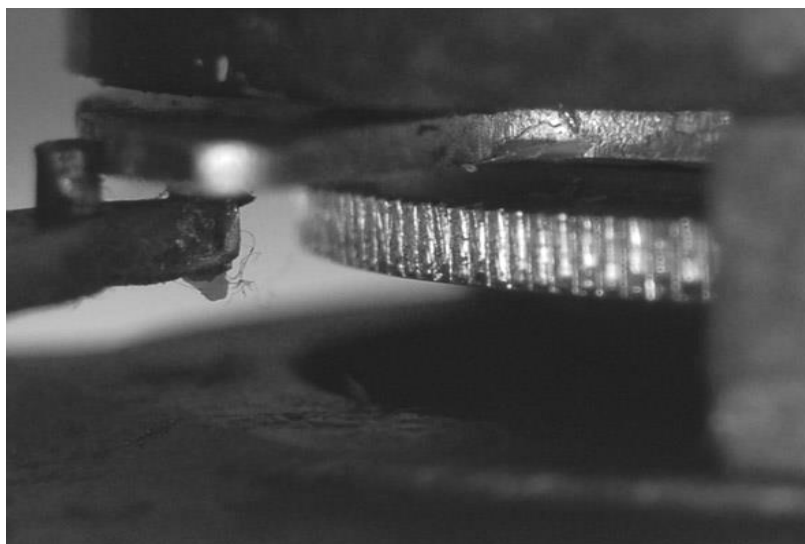


Рис. 1.11.1.7 – Удосконалений дисковий зубчастий напрямник
гвинта кругового мікротому «Кріо-Х»

У гніздо полозків повзунка столика вмонтовано додаткову фіксуючу пластину, що забезпечує більш точну його фіксацію та підйом (рис. 1.11.1.8)

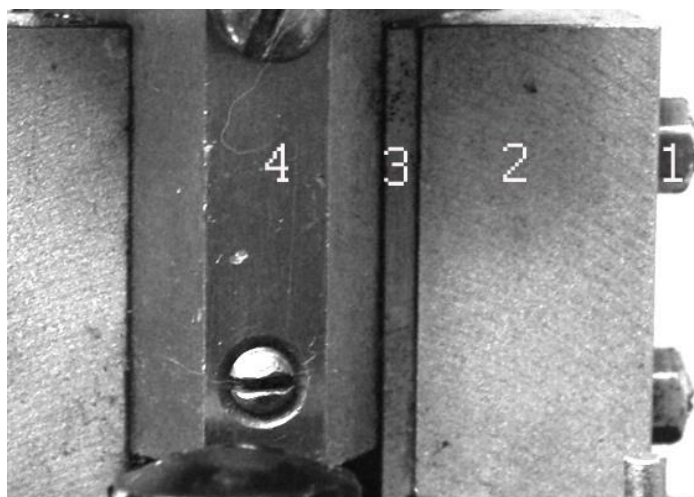


Рис. 1.11.1.8 – Повзунок столика кругового мікротому «Кріо-Х»

- 1 – гайка станини;
- 2 – полозки станини;
- 3 – фіксуюча пластина;
- 4 – повзунок

Майданчик столика для заморожування, при необхідності може слугувати для напаявання великих блоків (рис. 1.11.1.9).

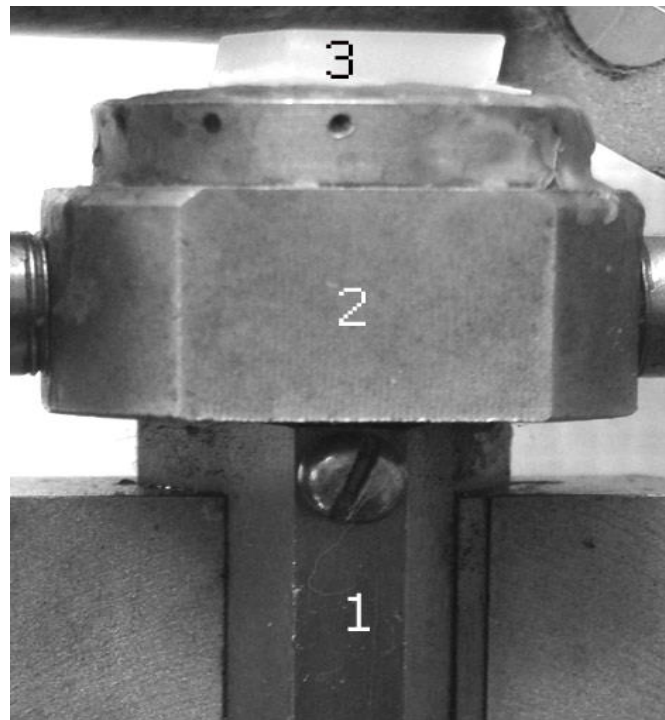


Рис. 1.11.1.9 – Столик колового мікротому «Кріо-Х»

1 – полозкова основа столика;

2 – майданчик столика;

3 – парафіновий блок

Виконані у конструкції зміни дозволили отримати такі результати:

1 – обертання дискового зубчастого напрямника забезпечує автоматичний поворот мікрометричного гвинта на 3° : в цей час повзунок і столик піднімаються на 2,0 мкм.

2 – в усіх вузлах мікротома досягнуто мінімізації тертя площ поверхонь. Це практично виключає появу проміжків та вибоїн і, відповідно, робить роботу приладу максимально точною (робочий діапазон апарату – 2,0-30,0 мкм).

Разом з цим необхідно зазначити, що подальше зменшення величини витків різьби гвинта і мікрометричного внутрішнього діаметра вертикальної

несучої гайки є недоцільним як внаслідок технічної складності їх виконання, так і імовірності швидкого зношування деталей в процесі експлуатації.

1.11.2 Вибір мікротомного ножа

Мікротомний ніж у поперечному перерізі є клин, ріжучий край якого додатково клиноподібно заточений (рис. 1.11.2.1).

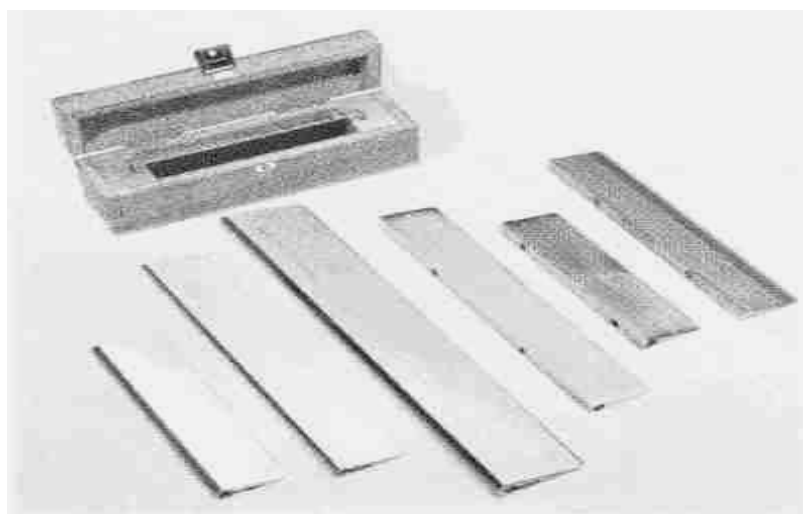


Рис. 1.11.2.1 – Мікротомні ножі

Ножі різняться між собою наступними параметрами (табл. 1.11.2.1).

Таблиця 1.11.2.1 – Параметри мікротомних ножів

Дровжина, см	Тип	Форма клина	Шліфування
8 – 13	малий	двоякоувігнутий	тонкий
17 – 19	середній		
25 і більше	великий		
8 – 13	малий	плоскоувігнутий	тонкий
17 – 19	середній		
25 і більше	великий		
8 – 13	малий	прямий	грубий
17 – 19	середній		
25 і більше	великий		

Примітно, що прямі ножі найчастіше використовуються для різання парафінових (парафін-целоїдинових) блоків: вони мають дуже міцне загартування, що є необхідним для тривалого збереження належної гостроти. Це положення має відносне значення: за необхідності можна різати будь-які об'єкти будь-якими ножами.

1.11.3 Точка та правка мікротомних ножів

Після кожного різання ніж необхідно правити: в цей час ним проводять по правочному реміню спинкою вперед, починаючи від ручки і таким же рухом, як під час наточування. Поворот на інший бік робиться обов'язково через спинку.

Якщо ріжучий край ножа зазубрився, його необхідно заточити. Точать мікротомні ножі на каменях, що мають дуже дрібне зерно (білий американський камінь, або арканзас; жовтий бельгійський камінь) (рис. 1.11.3.1).

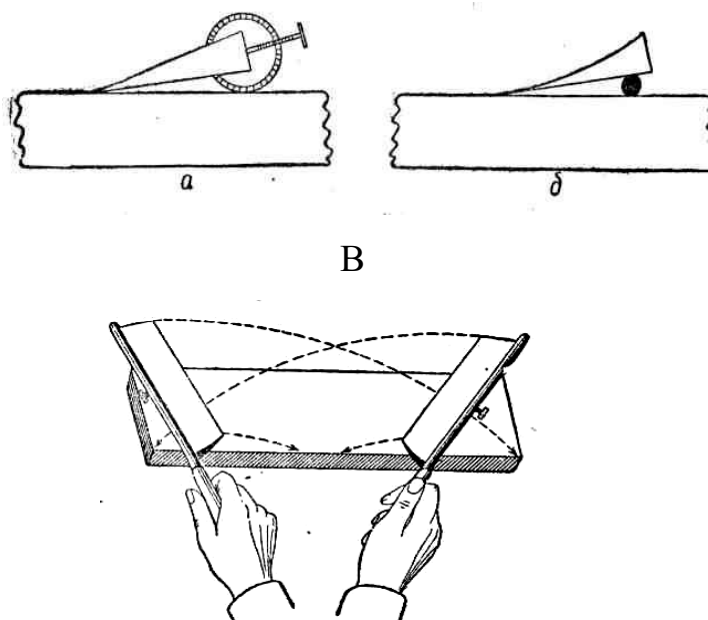


Рис. 1.11.3.1 – Техніка наточування мікротомного ножа

А – за допомогою трубчастої направляючої;

Б – за допомогою дротяної направляючої;

В – техніка перекидання ножа «через обушок»

Наточування мікротомного ножа відбувається під час змочування наточувального каменю якою небуть рідкою речовиною. У якості останньої застосовується проста або мильна вода, суміш рівних частин етилового спирту і синтетичного гліцерину, рицинова або вазелінова олія.

Під час вибору того або іншого рідкого середовища слід мати на увазі, що у разі тонкого наточування (більш повільне), необхідно обробляти олією, а у випадку грубішого і швидкого – водою або мильним розчином.

З метою економії робочого часу, а також підвищення якості заточування та виправлення ножів використовують спеціальні верстати, наприклад «ЗСП-2» (виробництва ТОВ «НВП «Мікромед» (м. Харків). Обладнання призначене для особливо тонкого виправлення мікротомних ножів, що мають довжини 100 ,0, 180,0, 250,0 мм та відповідних ДСТУ 64-561-77.

1.11.4 Нахил мікротомного ножа та вибір кута різання

Під час різання укладеного в парафін (парафін-целоїдин) матеріалу ніж завжди закріплюється у затискачеві похило, дещо під гострим кутом до горизонтальної площини. Ніж правильно ріже тільки у тому випадку, якщо він щоразу підходить до блоку своїм кінцем для різання (рис. 1.11.4.1).

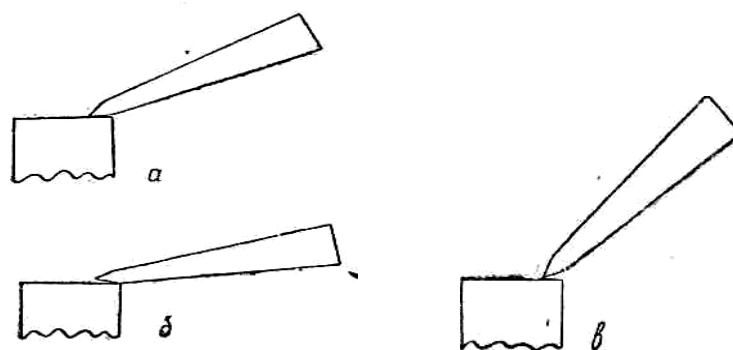


Рис. 1.11.4.1 – Встановлення мікротомного ножа у відношенні до блоку

А – правильне встановлення;

Б, В – неправильне встановлення

Як видно з рисунка Б, під час горизонтального встановлення ножа різання відбувається не вістря, а кутом, утвореним площинами заточування і основного клина. В цьому випадку блок зазнає сильного тиску, а під час зрізання товстого зрізу може бути легко зірваний. Непридатний для роботи і дуже крутий нахил ножа (див. рис. В). У цьому випадку ніж буде шкребти, а не різати блок.

1. Найбільш сприятливий до роботи кут різання становить приблизно 10-15° (див. рис. А); критерієм правильного встановлення ножа є отримання рівних і неушкоджених зрізів після кожної подачі блоку.

2. Наш досвід показує, що якість зрізів можна значно підвищити, попередньо вимочивши парафінові блоки у суміші гліцерину та аніліну (9:1) протягом доби. Ми відзначаємо, що цей прийом є найбільш придатним для роботи з тканинами, що погано зневоднені, в той час як під час роботи з повністю зневодненим матеріалом він не дає жодних переваг.

1.11.5 Техніка приготування парафінових (парафін-целоїдинових) зрізів

Зрізи готують відповідно до таких правил:

1. Перевірити справність вузлів мікротома;
2. Встановити ніж у ножотримач;
3. Брусочок з блоком зміцнити в об'єктоутримувачі таким чином, щоб робоча поверхня блоку була встановлена паралельно відносно краю ножа, а кут блоку торкався до довжини ножа;
4. Ніж пересунути у крайнє положення, зміцнити, за допомогою грубої подачі блоку вгору знімати надлишок парафіну доти, доки не оголиться робоча поверхня залитого матеріалу;
5. Пересунути ніж у робоче положення, надійно зміцнити;
6. Встановити бажаний кут різання та нахилу ножа;
7. За допомогою мікрон-ноніуса встановити бажану товщину зрізу;
8. Плавними та швидкими рухами зробити пробне різання;

9. Домогтися отримання парафінової стрічки.

Якщо матеріал залитий досить якісно, ніж має гарну якість заточування та правки, кути різання та нахилу ножа підібрані правильно, зрізи виходять тонкі, неущожені, з правильними контурами.

Насправді, під час виконання зрізів, можливі помилки, які потрібно своєчасно виправляти (табл.1.11.5.1).

Таблиця 1.11.5.1 – Помилки, що виникають під час різання парафінових (парафін-целоїдинових) блоків та шляхи їх усунення

Помилка	Причина помилки	Усунення
матеріал ріжеться погано, або не ріжеться взагалі	загальне переущільнення	фіксувати розчином формаліну меншої концентрації, сумішшю Буена або Ружа
		зневоднювати в метанолі або диоксані
		встановити оптимальний час знаходження в інтермедіаторі
мікротом «пропускає»	ніж встановлений занадто полого, або тупий для даної товщини зрізів	змінити нахил ножа, нагострити його або пересунути
зрізи кришаться	тугоплавкий парафін	використати більш легкоплавкий сорт парафіну
	погане просочування парафіном	довести матеріал до 96% етанолу, добре зневодити і повторити заливку знову
		збільшити час перебування в 1-му парафіні
	в заливальному середовищі недостатньо пластифікатора	додати в розплав ущільнюючого середовища небагато воску
	кут нахилу ножа перевищує 20 °	встановити оптимальний кут різання

Продовження таблиці 1.11.5.1

неправильний контур зрізів	невірна обрізка блоку	надати блоку правильної форми
	неправильне розташування блоку відносно ножа	правильно встановити блок
		встановити правильний кут різання
зрізи прилипають до ножа	в ущільнюючому середовищі занадто багато воску	встановити оптимальний склад ущільнюючого середовища
	легкоплавкий парафін	використати більш тугоплавкий сорт парафіну
	висока температура зовнішнього середовища	використати парафіново-ланолінову суміш
зрізи зкручуються	висока температура зовнішнього середовища	використати парафіново-ланолінову суміш
	малий кут нахилу ножа	встановити оптимальний кут нахилу ножа
зрізи виходять гофрованими	погана заливка	замінити парафін (перезалити)
зрізи рвуться	ніж притуплений або зазубрений	провести нагострення і правку ножа
	переущільнення окремих тканинних компонентів	Фіксувати розчином формаліну меншої концентрації, сумішшю Буена або Ружа
		встановити оптимальний час нахождения у спиртах та інтермедіаторі
товщина зрізу неоднорідна	загальне переущільнення	встановити оптимальний режим фіксації і заливки
	погане просочування парафіном	перезалити матеріал
	ніж притуплений або зазубрений	встановити оптимальний кут нахилу ножа
ніж «скакає» через об'єкт	ніж встановлений занадто полого	змінити нахил ножа
зрізи погано розправляються і монтуються на склі	занадто товсті зрізи	за можливістю зменшити товщину зрізів
	температура води нижче 35 °C	довести температуру води до 40-42 °C

1.11.6 Нові принципи роботи мікротомів: шляхи пошуку та альтернативні рішення

Традиційний принцип, який було покладено основою дії більшості мікротомів, у тому, що процес різання здійснюється рухом об'єкта на ніж, або, навпаки, у бік лінії вістря зі швидкістю 1-2 м/сек. В цей час виникає досить високий тиск ножа на об'єкт, тому одержання тонких зрізів з пружного матеріалу, близького за твердістю до целоїдину або парафіну не становить особливих труднощів. Однак, тканини гідробіонтів, на які діє великий тиск мікротомного ножа, незважаючи на гарну якість просочення ущільнюючими середовищами, піддаються деформаціям та місцевим розривам сильніше, ніж тканини інших хребетних тварин.

Наші спостереження показують, що в процесі різання парафінові та парафін-целоїдинові блоки дещо «просідають»: з одного боку, це викликано деформацією заливального середовища внаслідок дії на нього ножа, з іншого боку – м'яка тканина відчуває подвійне здавлювання, як з боку заливального середовища, так і з боку ножа (рис. 1.11.6.1).

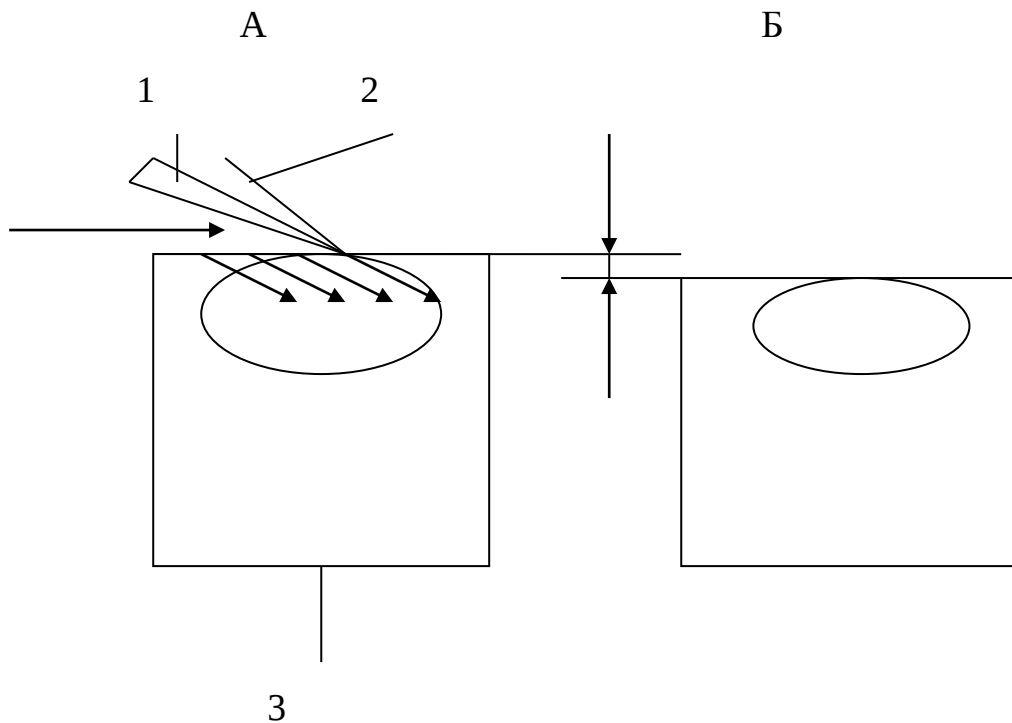


Рис. 1.11.6.1 – Вертикальна деформація, або «усадка» блоку

А – початок різання;

Б – кінець різання: блок та тканина деформовані.

1 – мікротомний ніж;

2 – зріз;

3 – блок із залитою в нього тканиною.

У тканин різної щільності швидкість і ступінь осідання також різні: зазначено, що «усадка» блоку відбувається вже через 3-4 секунди після удару ножом. Уникнути цього явища неможливо, оскільки необхідно деякий час для приведення утримувача мікротомного ножа у вихідне положення.

Цей ефект іноді можна успішно використовувати з метою зменшення товщини зрізів; в цілому ж ми вважаємо, що він є основною причиною невдалого різання блоків. Результати, отримані нами під час використання доступних моделей мікротомів («МС-2», «МС-4») підтверджують цей факт; дещо кращими були результати під час використання моделі ротаційного мікротома «РМ-1» і колового заморожувального мікротома «Кріо-Х». Таким чином, у зв'язку з існуванням у лабораторній практиці проблем, пов'язаних із різкою різноманітністю гістологічних об'єктів, виникла необхідність їх вирішення за допомогою нестандартних підходів.

Порівняно недавно для вирішення проблеми різання м'яких тканин у мікротомії почали використовувати нові принципи роботи. Огляд літературних даних показує, що в теперішній час в практику мікроскопічних досліджень впроваджується ряд нових приладів і механічних пристроїв, за допомогою яких можна істотно прискорити процес підготовки біологічних об'єктів до дослідження і значною мірою покращити їх збереження. Однак, на жаль, немає серійного випуску нових моделей мікротомів; недостатньо висвітлено питання про пристрої перспективних моделей, принципи їх роботи та можливі сфери застосування.

Як вже згадувалося, отримання тонких (2,0-4,0 мкм) і якісних зрізів безпосередньо м'яких тканин з використанням звичайних способів різання

ножем, не завжди дає позитивний результат. Порівняно недавно для вирішення існуючої проблеми було застосовано нові методи. Один з них полягає в тому, що для отримання зрізів був використаний надшвидкісний режим різання (Sterba G. [60] Mc Ilwain H. and Buddl H. [47]), при якому лезо товщиною 60 мкм оберталося на жорсткому диску навколо своєї осі зі швидкістю 69-167 м/сек, розсікаючи об'єкт, що повільно і поступально подається на нього. На приладі виходили зрізи товщиною 12,0-15,0 мкм (об'єкт – нирки, головний мозок). Однак, такий спосіб пов'язаний з великим ударним навантаженням на об'єкт, внаслідок чого зрізи часто рвалися і мали нерівномірну товщину.

Інші автори (Smith R.E. [57], Smith R.E., Fargynar M.G. [58], Frank W. [28]) при аналогічному методі різання запропонували додатково ущільнювати об'єкт заливкою в 7% агар без подальшого заморожування на кріостаті. Це дозволило досягти певної рівномірності товщини зрізів, проте їх товщина залишалася досить високою – від 20,0 до 160,0 мкм.

Особливий інтерес для мікротомії м'яких тканин є використання принципу вібрації ножа в процесі різання уздовж лінії вістря. Перший вібраційний мікротом – «вібротом», був сконструйований Е.П. Гусельніковим [51]. Є також повідомлення про створені пізніше оригінальні конструкції «Oxford Vibrotom» (Smith R.E. [58]) та вібраційний лезовий мікротом (рис. 1.11.6.2).



Рис. 1.11.6.2 – Вібраційний лезовий мікротом «Leica VT 1000S»
(Німеччина)

Прилади мають схожість у тому, що у них мікротомний ніж, який має певну частоту вібрації, наповзає на нерухомий об'єкт. Товщина зрізів від 10,0 мкм і вище, однак, рівномірність товщини є незадовільною внаслідок недосконалості конструкції тримача ножа та об'єкта різання. Вперше ці недоліки значною мірою було усунуто під час створення вібраційного мікротому В.Б. Скупченко [10]. Позитивний результат залежав не тільки від оригінального способу розміщення вібруючого ножа (частота вібрації – 50000 Гц), але і від способу подачі об'єкта на нього (рис. 1.11.6.3, 1.11.6.4).

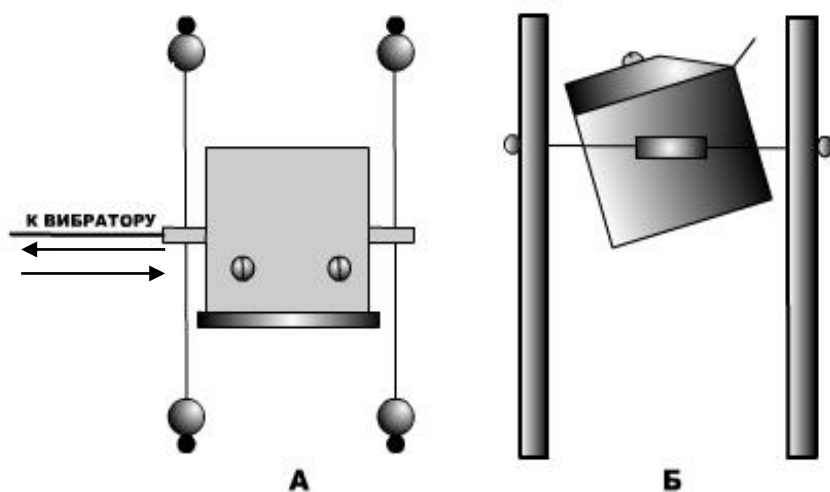


Рис. 1.11.6.3 – Схема підвіски вібруючого ножотримача

А – вид зверху;

Б – вид збоку

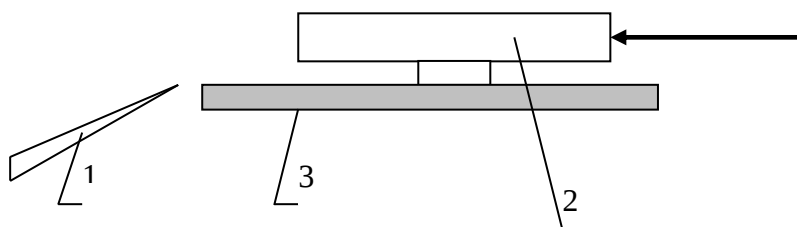


Рис. 1.11.6.4 – Схема подачі парафінового блоку на вібруючий ніж

1 – мікротомний ніж;

2 – парафіновий (парафін-целоїдиновий) блок;

3 – напрямна пластина

Як видно, ніж разом з ножотримачем підвішений на туго натягнутих струнах, а блок подається на вістря ножа, ковзаючи по напрямній пластині.

Аналіз результатів роботи вібраційного мікротому Скупченко показує, що додаткова фіксація блоку на поверхні пластини і незначне притискання його зверху підвищують пружність шару, що зрізається. Такий метод значно зменшує ударну силу ножа на об'єкт і дозволяє отримати досить тонкі (8,0-10,0 мкм) зрізи. Істотним недоліком цієї моделі є громіздкість підвіски ножа і неможливість її коливального руху прямолінійною траєкторією. Цей дефект виникає як наслідок дії сили тяжіння на підвіску ножа: навіть сильне натягнення струн усуває його лише частково.

Іншим недоліком цієї моделі є наявність недостатньо жорсткого об'єктоутримувача і дуже недосконалого механізму мікроподачі: він складається всього з однієї градуйованої гайки з досить великим кроком різьблення. Слід зазначити, що ці недоліки існують і в сучасних моделях вібраційних мікротомів: на товщину зрізів та їх рівномірність впливає повна відсутність будь-якої фіксації об'єкта (блоку) за межами ножа (рис. 1.11.6.5).

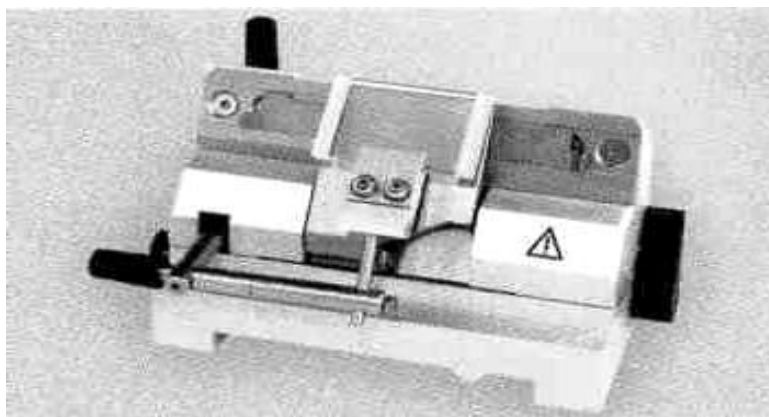


Рис. 1.11.6.5 – Напрямна пластина механізм мікроподачі та ножотримач вібраційного мікротому «Leica VT 1000S» (Німеччина)

З метою усунення помилок та реалізації можливості зменшення тиску різання необхідно досягти його значення близько кількох сотень одиниць. Кутове різання – перспективний спосіб, при якому виконуються роздільно два

рухи уздовж лінії вістря ножа і поперек нього, причому швидкість руху об'єкта уздовж вістря повинна у кілька сотень разів перевищувати поперечну (Bögréné V., Bodrogi G., Kis A., [15]).

Кутове різання матеріалу, залитого в ущільнювальні середовища, дозволяє максимально захистити його від розривів та нерівномірної товщини. Для розгляду механізму цього різання необхідно знати особливості взаємодії ножа і об'єкта. Головне в процесі різання – це створення високого локального тиску вістря на матеріал, що зрізається. В цей час в об'єкті виникає деформація розтягування, що досягає межі її міцності, під дією якої розриваються зв'язки між структурами; бічні грані ножа розсувають окремі частини.

Величина сили, з якою ніж тисне на об'єкт, що розрізається, залежить від багатьох факторів. До них відносяться, з одного боку, довжина дотику ножа та об'єкта; кут, що утворюється лінією вістря ножа та напрямом руху під час різання; радіус закруглення ріжучого краю тощо; з іншого боку – пружність та міцність самого об'єкта. Якщо прийняти умовно, що маємо справу з досить однорідним еластичним матеріалом, то тиск, у якому досягається межа міцності, є величиною постійної і є тиск різання P_p . У разі зрізання об'єкта буде досягнуто лише тоді, як у ньому буде створений тиск різання. Причому зі збільшенням питомої площі S_y , що припадає на одиницю довжини вістря ножа, що створює тиск P_p , зростає загальна сила F_p , що тисне на об'єкт і сила, що вимірюється:

$$F_p = S_y \cdot P_p \cdot 1; \text{ де} \quad 1)$$

1 – довжина проекції лінії вістря, яка контактує з об'єктом на нормальному напрямку різання.

У класичної мікротомії маємо справу з об'єктами, закріпленими консольно, тобто з одного кінця: поверхня, що зрізається, вільна і та, що утримується силами структурних зв'язків самого об'єкта. Тому різання можна здійснити, якщо пружність у шарі, що зрізається, за величиною є більшою, ніж величина

загальної сили різання F_r , яка надається ножом. З зменшенням товщини шару, що зрізається, зменшується і зустрічна сила пружності, що виникає у даному шарі. Таким чином, головний фактор, за рахунок якого можна зменшити товщину зрізів – сила різання. Єдиний шлях отримання тонких зрізів слабoprужних об'єктів (за існуючих параметрів ножів) – зміна способу різання. Один із таких способів – лінія вістря ножа ставиться не впоперек напрямку його руху, а під кутом.

Сила різання F_y , що припадає на одиницю довжини вістря ножа, залежить від питомої площі його дотику S_y та тиску різання P_p :

$$F_y = S_y \cdot P_p ; \quad 2)$$

Тільки після досягнення питомої сили різання F_y може здійснитися процес відсікання об'єкта. Як мінливу величину приймемо кут нахилу лінії вістря до напрямку руху різання. У випадку, коли лінія вістря стоїть перпендикулярно до напрямку руху, загальна сила F_r , з якою ніж тисне на об'єкт, дорівнює сумі сили різання F_y на довжину лінії дотику ріжучого краю ножа зі зразком шириною «А»:

$$F_p = F_y \cdot l = F_y \cdot A ; \quad 3)$$

У цьому положенні довжини дотику вістря ножа з об'єктом довжини «А» та її проекцією на нормальний напрямку руху дорівнюють. При цьому F_p збігається з нормаллю напрямку руху і дорівнює за величиною силі перпендикулярної лінії вістря:

$$F_n = F_p ; \quad 4)$$

У тому випадку, коли об'єкт рухається під кутом до лінії вістря, виникає наступна картина (рис. 1.11.6.6).

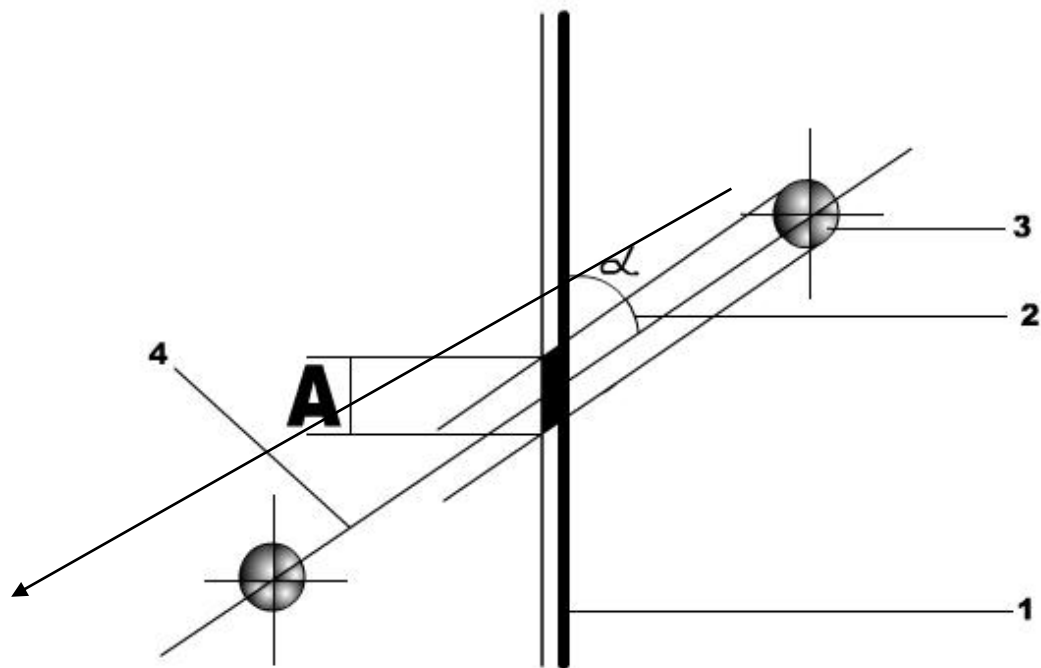


Рис. 1.11.6.6 – Схема кутового різання

1 – лінія вістря ножа;

2 – кут руху, α ;

3 – проекція довжини дотику об'єкта та ножа («A»);

4 – напрямок руху.

Проекція довжини зіткнення «A» леза з об'єктом на нормаль до напрямку руху $1L$ становить величину:

$$1L = A \cdot \sin \alpha; \quad 5)$$

Звідси сила різання дорівнює:

$$F_p L = 1L \cdot F_y = A \cdot \sin \alpha \cdot F_y; \quad 6)$$

При розкладанні $F_p L$ на 2 складові, спрямовані уздовж лінії вістря та перпендикулярні до неї, остання знаходиться як:

$$F_n L = F_p L \cdot \sin \alpha = F_y \cdot A \cdot \sin \alpha \cdot \sin \alpha = F_y \cdot A \cdot \sin^2 \alpha; \quad 7)$$

Величина питомої сили, спрямованої паралельно до лінії вістря і довжини краю ножа, що припадає на одиницю, становить у такому випадку:

$$F_{ny} L = (F_n L) : A = (F_y \cdot A \cdot \sin^2 \alpha \cdot \sin \alpha) : A = F_y \cdot \sin^2 \alpha; \quad 8)$$

Співвідношення загальної сили різання, що збігається з напрямком руху при прямому і похилому встановленні лінії вістря, дорівнює:

$$K = F_p L : F_p L = (F_y \cdot A) : (F_y \cdot A \cdot \sin \alpha) = 1 : \sin \alpha \quad 9)$$

Таким чином, величина, зворотна синусу кута нахилу лінії вістря до напрямку руху, показує, скільки разів зменшується сила різання об'єкта однієї і тієї ж ширини у відношенні до випадку з поперечним встановленням ножа. Чим менший кут нахилу ріжучого краю, тим у більшому ступені зменшуємо силу різання.

Цей метод успішно здійснюється за допомогою кутового мікротома (Козій М.С. [3]), сконструйованого на базі вібраційного мікротому Скупченко (рис. 1.11.6.7).

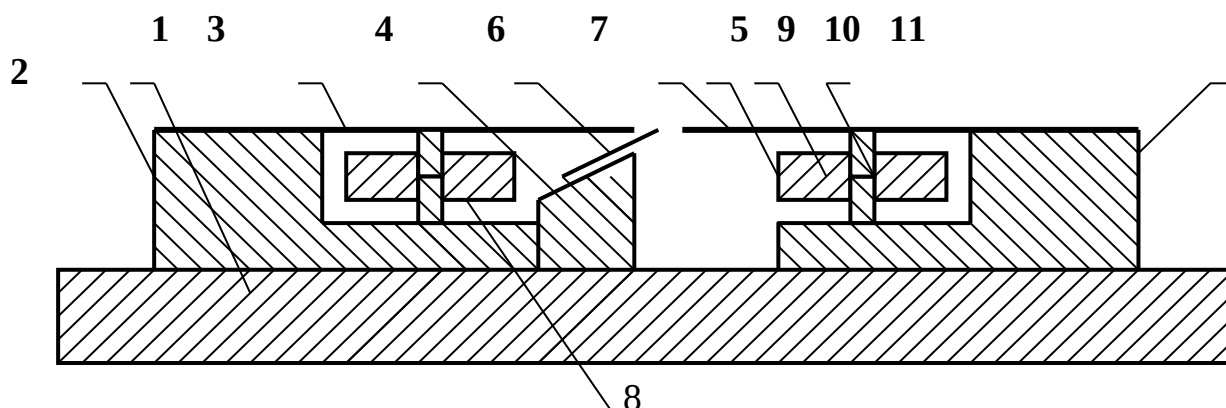


Рис. 1.11.6.7 – Схема кутового мікротому

Прилад містить тримачі (1, 2), закріплені на основі (3) за допомогою чотирьох направляючих та чотирьох регулюючих гвинтів; приймач (4) і подавач (5) Г-подібні пластини, між якими знаходиться блок (6) кріплення ножа (7), а під ними та основою (3) розташовані два механізми мікроподачі об'єкта (8,9), кожен з яких включає гайку (8, 9, 10), насаджену на гвинт (11), що має різьблення, аналогічне кроку гайки (10).

Кутовий мікротом працює так. Тримачі (1) і (2) закріплені на висуванні (3) за допомогою направляючих та регулюючих гвинтів. Їх розводять у крайнє положення разом із закріпленими на них (4) та (5) Г-подібними пластинами. На блоці (6) закріплюють ніж (7) та встановлюють за допомогою механізмів мікроподачі (8, 9, 10, 11) необхідний проміжок для отримання зрізу заданої товщини. Для цього ручкою механізму повертають гайку (9, 10), насаджену на гвинт (11). Плавний та надійний хід механізмів мікроподачі досягається за рахунок кроку різьблення гайки (9, 10), що відповідає аналогічному кроку різьблення гвинта (11).

Прилад має такі переваги:

1. Наявність другої (приймаючої) плоскопаралельної пластини дозволяє не тільки жорстко фіксувати у визначеній площі блок, що розрізається, але і підтримувати постійним значення сили пружності об'єкта і тим самим зменшувати товщину зрізу без видимих дефектів.

2. Обидві плоскопаралельні пластини виконані у формі літери «Г», що передбачає кутове різання. Цей метод у деяких випадках дозволяє різати або надто м'які (нефіксовані) об'єкти, або надто тверді (кістки, хрящі).

3. Замість мікротомного ножа особливої конфігурації використовується звичайне лезо безпечної бритви, що позбавляє рутинної процедури заточення і правки.

4. Використано механізм регулювання товщини зрізів, що ґрунтується на принципі «поштовху гвинта». Його робота є набагато точнішою, ніж у моделі Скупченко (у вібраційному мікротомі цей механізм складається з одного гвинта та гайки).

5. Мікротом має невелику масу – 1,5 кг (для порівняння: санний мікротом – 36,0-38,0 кг, вібраційний мікротом Скупченко – 8,0 кг), внаслідок чого може бути рекомендований для використання в умовах польової практики.

6. Робочий діапазон приладу: 5,0-30,0 мкм.

Слід відзначити, що отримання більш тонких зрізів за допомогою цієї моделі важко, у зв'язку з чим виникла необхідність модифікації в кутовому мікротомі деяких вузлів.

Тримач ножа мікротома складається з двох частин: основи та притискаючої пластини, з'єднаних двома гвинтами; в цей час край леза ножа лише трохи виступає з блоку. З цього випливає, що кут нахилу приладу має постійну величину. Відомо, що те саме значення кутової величини можна застосувати стосовно різання лише деяких типів тканин. З метою розширення кутового діапазону конструкції блоку кріплення ножа були виконані наступні зміни (рис. 1.11.6.8).

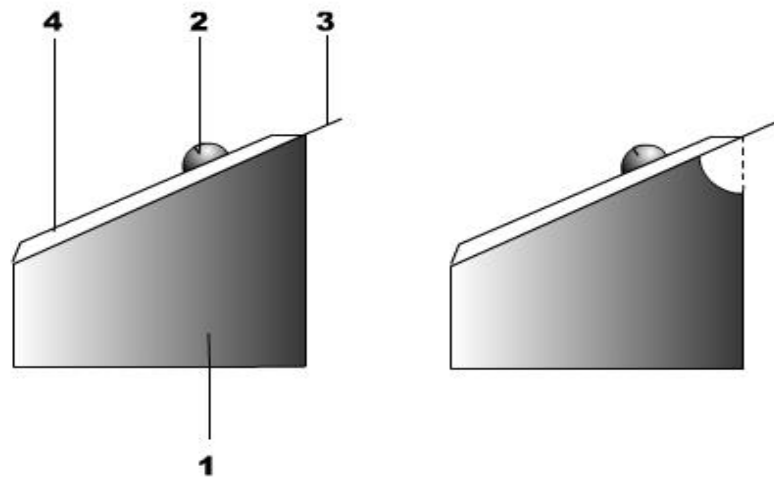


Рис. 1.11.6.8 – Блок кріплення ножа кутового мікротому

А – первинний варіант;

Б – удосконалений варіант

1 – основа;

2 – гвинт;

3 – ніж;

4 – притискна пластина

Як видно з рисунка 1.59, кут заточування притискної пластини (4) спочатку становив близько 25° , в цей час нижній простір приймаючої пластини повністю контактує з площею заточування (див. рис. 1.58). Виконавши лінзове фрезерування переднього верхнього краю основи (1) у місці розташування довжини краю ножа (3) на глибину 2,0 мм і змінивши кут заточування притискної пластини (4) до 15° , стало можливим правостороннє переміщення приймаючої пластини і, відповідно, її «наповзання» на гнучкий ніж (рис. 1.11.6.9).

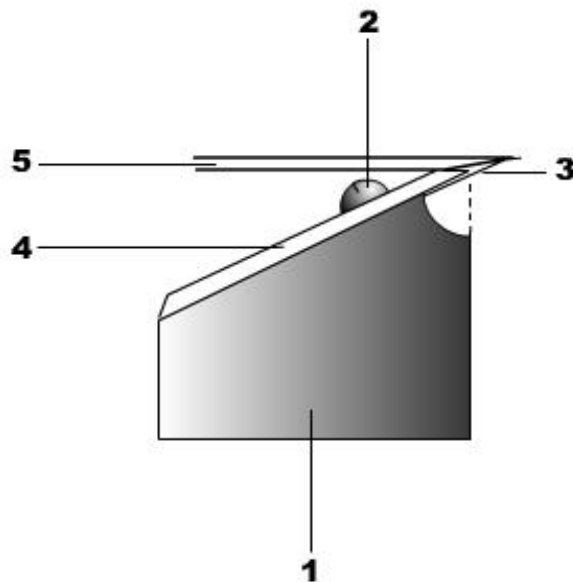


Рис. 1.11.6.9 – Зміна кута різання на кутовому мікротомі

- 1 – основа;
- 2 – гвинт;
- 3 – ніж;
- 4 – притискна пластина;
- 5 – приймаюча пластина

Як видно з рисунка 1.60, при «наповзанні» на ніж (3) приймаючої пластини (5), його край заглиблюється в паз верхнього переднього краю основи (1): відбувається зміна величини кута різання. Таким чином, в результаті введеної модифікації межа кутових величин мікротома коливається в межах 13-25°, що значно розширює робочий діапазон приладу.

Пластини кутового мікротома (що подає та приймаюча) мають вигляд букви «Г». Площа верхньої та нижньої поверхонь пластин неоднакова: зверху вона більша, ніж знизу. Різниця полягає у кутах заточування нижніх терміналів; у направляючої пластини вона становить 45°, а у тієї, щоподає – 5°: під час поступального накладання її на край ножа, останньому передається необхідна величина кута, тобто оптимальна величина кута різання.

Верхня та нижня поверхні пластин спочатку були плоскопаралельні. Одноразовий ніж має гнучкість: з цього випливає, що можлива зміна кривини

його довжини. Для цього в ділянці нижнього кутового заточування фрезерування було виконано додаткове заточення жолобкуватої форми (рис. 1.11.6.10).

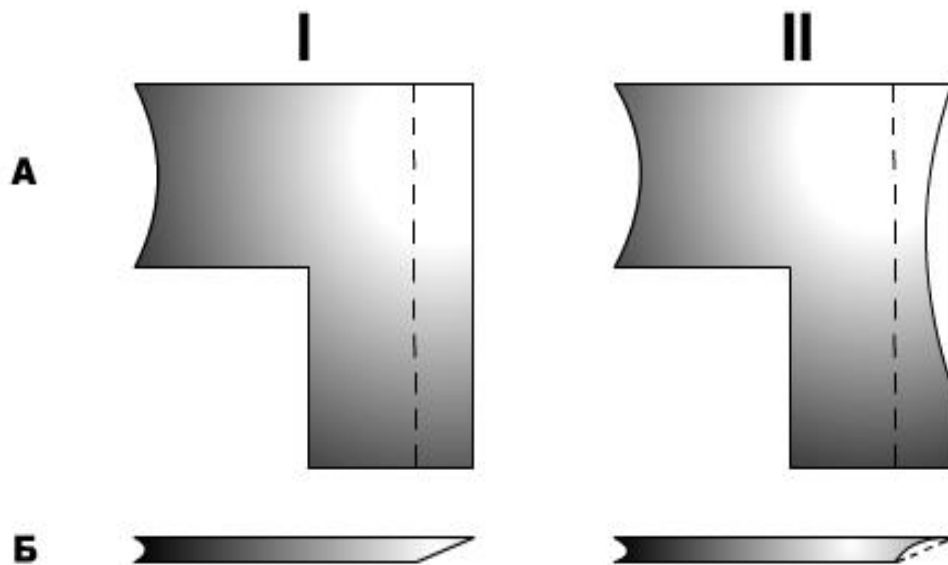


Рис. 1.11.6.10 – Схема заточування приймаючої пластини кутового мікротому

А – вигляд зверху;

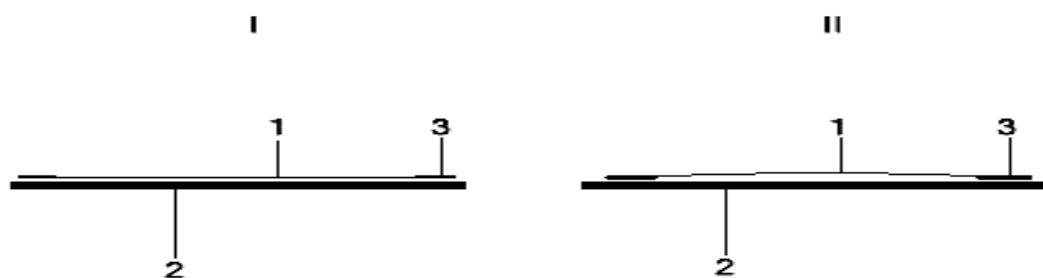
Б – вигляд збоку.

I – вигляд знизу: первісний варіант;

II – вигляд знизу: удосконалена конструкція.

Таким чином, нижня поверхня приймаючої пластини, в ділянці додаткового заточування приймає форму еліпса або арки (пікова глибина становить 1,0 мм). З цього випливає: під час притискання зверху довжина ножа точно повторює параметри кривини заточування пластини. Якщо ніж паралельний (початковий варіант), його вістря знаходиться над краєм пластини, що подає; в результаті удосконалення конструкції довжина ріжучого краю ножа нагадує арку (рис. 1.11.6.11).

А



Б

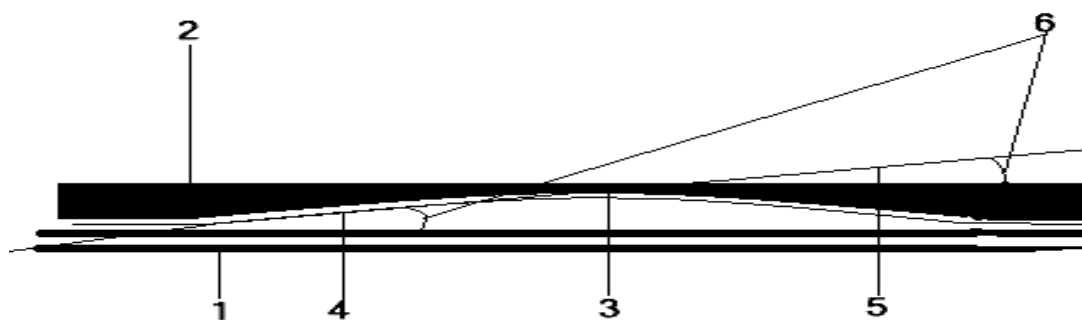


Рис. 1.11.6.11 – Положення ножа відносно пластини, що подає (вигляд спереду)

А. I – первинний варіант; II – удосконалений варіант.

1 – край ножа;

2 – пластина, що подає;

3 – пластина, що приймає.

Б. Удосконалений варіант (збільшено)

1 – пластина, що подає;

2 – пластина, що приймає;

3 – «арка» приймаючої пластини;

4 – край ножа;

5 – дотична кривина ножа;

6 – кут кривини ножа.

Як видно із рис. Б, величина проміжку між краєм ножа (4) і пластиною, що подає (1) точно відповідає товщині гістологічного зрізу. Перевага удосконаленого варіанту полягає в тому, що в крайовій ділянці ріжучого краю товщину зрізу практично можна довести до 0,5 мкм. В цілому ж, товщина зрізу нерівномірна: її різниця в центральній частині та крайовій зоні становить близько 2,0 мкм. Це не є недоліком, оскільки один і той самий зріз може бути використаний одночасно як для оглядових цілей, так і для точних гістологічних досліджень.

Під час різання деяких типів тканин (селезінка, тимус, пульпозна тканина кровотворних органів і т.п.), необхідно пам'ятати, що лінійні розміри їх клітин становлять лише 3,0-4,0 мкм. З цього випливає, що конструкція механізму вертикальної подачі направляючої пластини не дозволяє переміщати її на малі відстані. У серійних моделях салазкових мікротомів (Leica SM-2000R, HM-450, HM-200 Ergostar) мікрометричний гвинт, що приводить до руху повзунків з фіксованим блоком, має малу величину кроку різьблення (0,5 мм). Якщо припустити, що мікрометричний гвинт спрямований вертикально щодо станини мікротома, то підняття з його допомогою повзунка з блоком, що відповідає 1/3 кроку різьблення, дорівнює 5,0 мкм. Здійснити підйом об'єкта різання на висоту близько 3,0 мкм є можливим, якщо гвинт встановити стосовно станини мікротома під деяким кутом: у сучасних моделях мікротомів величина кута нахилу гвинта становить 35-45°. У кутовому мікротомі М.С. Козія [3], механізм мікроподачі, що складається з вертикально розташованих ідентичних гвинтів-штовхачів і гайки, що має ту ж величину кроку, що і в санному мікротомі, був удосконалений (рис. 1.11.6.12).

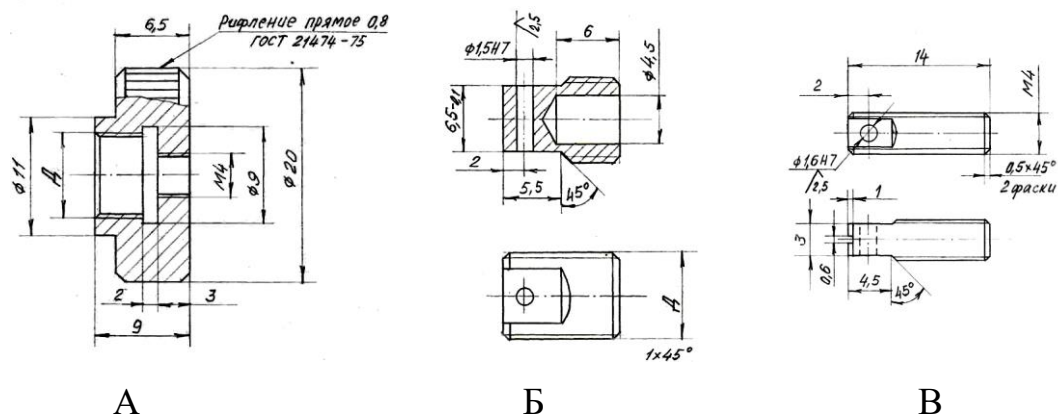


Рис. 1.11.6.12 – Креслення частин удосконаленого механізму
мікроподачі аркового мікротому [51]

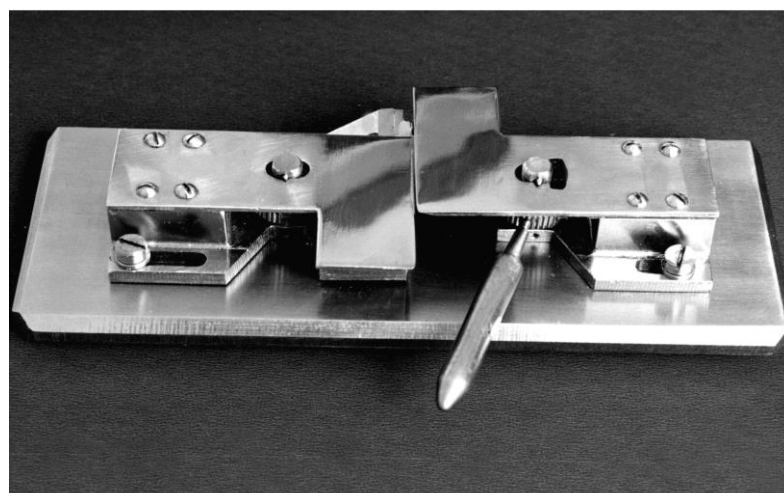
А – спеціальна гайка;

Б – верхній гвинт;

В – нижній гвинт

Як видно, він виконаний з двох гвинтів (Б, В), що мають різні значення кроків різьблення і з'єднаних один з одним особливою гайкою (А). Під час обертання такого механізму гайка переміщує гвинти за принципом «різниці кроків» – такий технологічний прийом дозволяє піднімати або опускати направляючу пластину на 2,0-3,0 мкм щодо краю ножа та отримувати гістологічні зрізи відповідної товщини.

Удосконалений варіант моделі колового мікротома виглядає так (рис. 1.11.6.13).



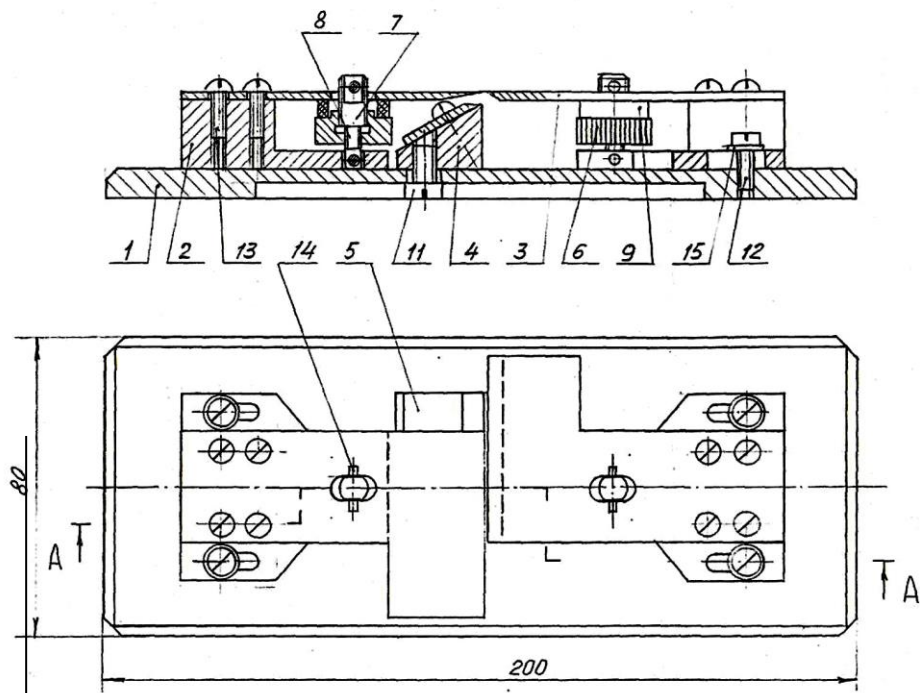


Рис. 1.11.6.13 – Арковий мікротом: зовнішній вигляд та креслення його складу

- 1 – основа;
- 2 – утримувач приймаючої пластини;
- 3 – пластина, що подає;
- 4 – колодка блоку тримача ножа;
- 5 – притискна планка тримача ножа;
- 6 – спеціальна гайка механізму мікроподачі;
- 7, 8 – гвинти механізму мікроподачі;
- 9, 10 – шайба;
- 11 – гвинт колодки блоку тримача ножа;
- 12 – гвинт утримувача пластини;
- 13 – гвинт пластини;
- 14 – штифт гвинта механізму мікроподачі;
- 15 – шайба.

Успішність роботи оператора на арочному мікротомі забезпечується, перш за все, ретельністю підготовки апарата до роботи та правильністю його налаштування:

1. Насухо витерти робочу поверхню приймаючої та направляючої пластин;
2. Замінити лезо у блоці тримача ножа;
3. Налаштувати направляючі пластини: зближувати їх до тих пір, доки пластина, що подає, і лезо не утворять дотичною лінією проміжок 0,2-0,3 мм, а приймаюча пластина накриє лезо, залишивши за своєю межею його край (ріжучу облямівку);
4. Жорстко закріпити гвинтами усі вузли;
5. Ручкою механізму мікроподачі дещо опустити направляючу пластину (для здійснення грубого різання);
6. Змастити робочі поверхні направляючих пластин синтетичним гліцериним (для вільного ковзання блоку поверхнею);
7. Притискаючи колодку з блоком до поверхні пластини (в цей час у жодному разі не качати її в боки), різким і швидким рухом перемістити об'єкт у бік приймаючої пластини (рис 1.611.6.14).

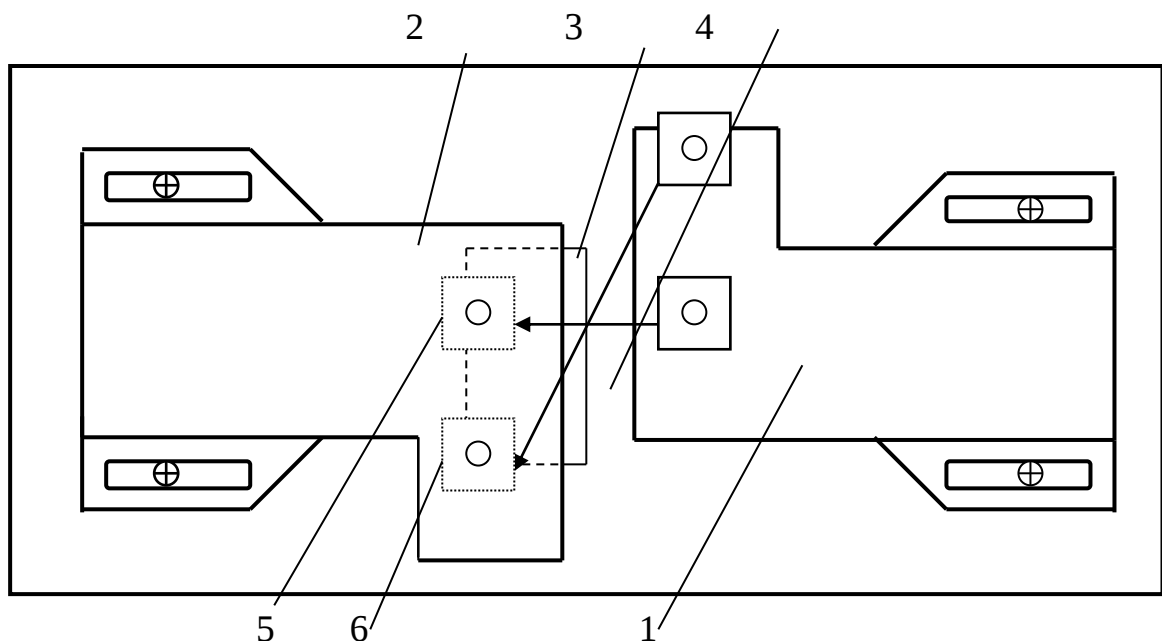


Рис. 1.11.6.14 – Схема різання парафінових (парафін-целоїдинових) блоків на арковому мікротомі

- 1 – робоча поверхня пластини, що подає;
- 2 – робоча поверхня приймаючої пластини;
- 3 – ріжуча кромка леза;
- 4 – проміжок;
- 5 – колодка із блоком для прямого різання;
- 6 – колодка із блоком для кутового різання.

Виконавши грубе різання (не більше 4-5 зрізів), за допомогою механізму мікроподачі необхідно дещо підняти направляючу пластину. Критерієм отримання досить тонких (4,0-5,0 мкм) зрізів є серія, або так звана парафінова стрічка. Готові зрізи знімаються з-під нижнього краю леза м'яким білим пензликом (№1) і ретельно сортуються.

Перш ніж прибрати блок для зберігання, незалежно від ступеня зневоднення тканини необхідно занурити його робочу поверхню в розплавлений парафін: це в подальшому захистить матеріал від руйнування. Після етикетування блоки зберігають у прохолодному темному місці. Термін їх зберігання необмежений.

1.11.7 Вибір та підготовка предметного скла

Стандартні предметні скельця для гістологічних та ембріологічних препаратів мають розмір 24,0 x 76,0 мм. Вони повинні бути не товщі 1,0-1,2 мм, не мати подряпин, каламутних плям та інших дефектів. Предметне скло товще 1,2 мм під час вивчення мікропрепаратів з імерсійним об'єктивом не дозволяє сфокусувати конденсор мікроскопа на препараті, що призводить до неправильного встановлення освітлення об'єкта і спричиняє значне недовикористання оптики мікроскопа.

В теперішній час деякі фірми, що спеціалізуються на випуску предметних та покривних скелець, випускають продукцію, яка не потребує попереднього

очищення (компанія «Menzel-Glasser», корпорація Thermo Fisher Scientific (Німеччина)).

Процедура попереднього очищення скелець обов'язкова і повинна виконуватися з особливою ретельністю: перед нанесенням суміші для клеїння, предметні скельця миють у спирті, ацетоні, розчині дворомовокислового калію (хромпіку) або двовуглекислої соди, потім ретельно споліскують дистильованою водою. Зберігають скельця в спирті або на повітрі в захищеному від пилу місці.

Для очищення нових предметних (і накривних) скелець достатньо їх промити в теплій мильній воді, і, перед тим, як проводити через спирт для надання блиску, обполоснути в декількох змінах чистої води. У деяких випадках автор рекомендує замінити спирт 1%-м розчином оцтової кислоти: при цьому предметне скло набуває виняткового блиску.

Наш досвід показує, що тривала підготовка скелець необов'язкова: досить добре протерти їх двічі – чистою вологою і потім сухою бавовняною тканиною. Можна також додатково прожарити попередньо очищене предметне скло протягом 0,2-0,3 хв. на середньому полум'ї пропанового пальника. На оброблену таким чином поверхню добре наноситься суміш для клеїння: прикріплені на неї зрізи надалі не відпадають.

1.11.8 Розправлення зрізів

Вирівнювання парафінових (парафін-целоїдинових) зрізів є важливим технологічним завданням, від якості виконання якого залежить їх цілісність, придатність до спостереження та мікрофотографування. У гістологічних лабораторіях з цією метою застосовують спеціальні ванни (рис. 1.11.8.1).

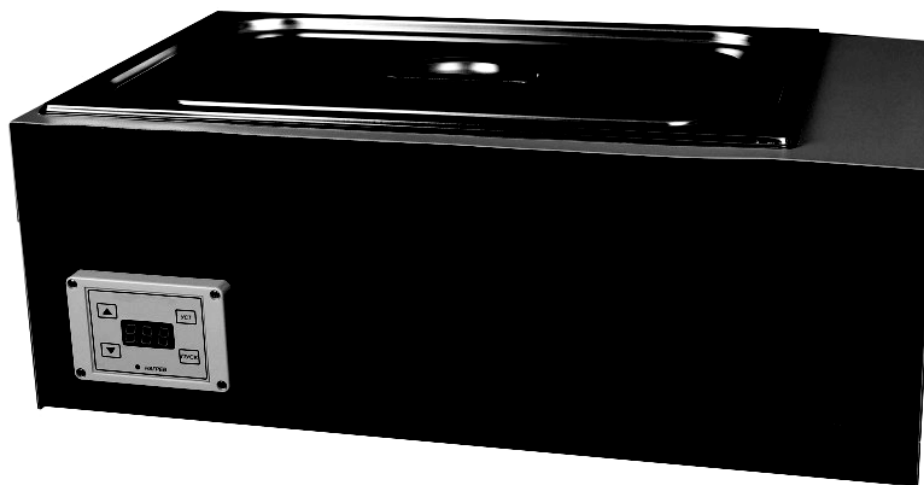


Рис. 1.11.8.1 – Ванна для розправлення парафінових (парафін-целоїдинових) зрізів Thermo Fisher Scientific (Німеччина)

За відсутності такого обладнання з успіхом можна обійтися наступним нескладним пристосуванням (рис. 1.11.8.2.)

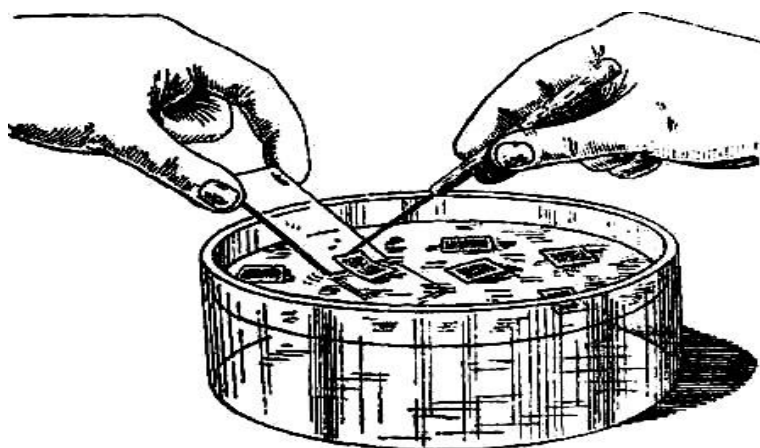


Рис. 1.11.8.2 – Розправлення зрізів

Отримані зрізи переносять сухим білим пензликом (№№ 0,5-1,0) в чашку з теплою (40°C) дистильованою або просто кип'яченою водою, де вони розпрямляються.

Використовувати з цією метою іншу воду не рекомендується: в ній є емульсія з повітряних бульбашок, що заважає нормальному розправленню.

Якщо немає можливості використовувати дистильовану або прокип'ячену воду, то в її 500,0 мл доцільно додати 30,0-40,0 мл 70% етанолу (це допоможе позбутися повітряної емульсії).

Під час роботи вода в ємності часто швидко вихолоняє і для підтримки постійної температури необхідно додати чергову порцію гарячої води. Так як постійний температурний контроль при цьому займає певний час, для зручності ми рекомендуємо використовувати стандартні металеві ємності гістологічних автоматів (об'ємом 700,0 мл) або судину Дьюара (об'ємом 500,0 – 1000,0 мл).

Доведено, що постійний температурний режим розправлення зрізів не завжди однаково придатний: температура води залежить як від ущільнюючого середовища, так і від товщини зрізу (табл. 1.11.8.1).

Таблиця 1.11.8.1 – Залежність температури води для розправлення зрізів від складу ущільнюючого середовища та товщини зрізів

Ущільнююче середовище (суміш), тип	Температура води, °C			
	товщина зрізу, мк			
	2 – 4	5 – 7	8 – 11	12 – 15
парафіново-воскова	42	42	43 – 45	48 – 50
парафіново-восколітна	40 – 42	40 – 42	41 – 44	43 – 45
парафіново-ланолінова	36 – 38	36 – 38	39 – 40	39 – 40

Показано, що деякі зрізи іноді необхідно дещо довше витримати у воді: якість розправлення при цьому покращується. Цю операцію слід проводити з обережністю, оскільки зайве зневоднення тканини значною мірою може спотворити справжню гістологічну структуру об'єкта.

Ми також зауважуємо, що дані таблиці дуже приблизні щодо тканин щільної консистенції: розправлення їх зрізів часто не залежить від складу ущільнюючого середовища та температури води. Ці зрізи вимушено товсті (до

20,0 мкм і вище), тканини деформовані. Додаткове підвищення температури води призводить до небезпеки розплавлення ущільнюючого середовища, а сам гістологічний об'єкт у ній майже не розпрямляється.

Єдиним, але не дуже зручним методом розправлення таких зрізів є механічний монтаж. Суть цього способу полягає у тому, що виловлений на предметне скло і наполовину розправлений зріз притискається до нього фільтрувальним папером. Наявні в літературі відомості про необхідність попереднього просочення паперу 70% етанолом, вимагають детальної перевірки у кожному окремому випадку. За нашими спостереженнями, з'єднання спирту з водою, що є в зрізі, призводить до екзотермічної реакції: зрізи вирівнюються, але згодом майже не тримаються на предметному склі.

1.11.9 Наклеювання зрізів

У більшості випадків під час виготовлення мікропрепаратів надійні результати дає наклеювання зрізів із застосуванням дистильованої води.

На скло з крапельниці (або піпеткою зі склянки) наливають 1,0-2,0 мл дистильованої води – утворюється шар, що рівномірно розтікається. На поверхню води препарувальною голкою або пензликом наносять зрізи у бажаному порядку. Розміри та кількість зрізів залежать від параметрів накривного скла та їх подовження під час розпрямлення. При легкому нагріванні на полум'ї спиртів парафін розм'якшується, зрізи розтягуються силами поверхневого натягу уздовж поверхні наливої води. Після розпрямлення зрізів предметне скло необхідно охолодити, потім шматочком фільтрувального паперу видалити надлишок води і одночасно за допомогою голки зорієнтувати розташування зрізів.

Після попереднього видалення води предметне скло зі зрізами потрібно перенести в термостат і не допускати випаровування залишків води при кімнатній температурі, так як в цьому випадку можуть залишатися щілини між холодним парафіном і предметним склом. У цьому випадку під час подальшої

обробки препаратів зрізи відпадуть. Якщо випаровування води відбувається під час нагрівання, коли парафін розм'якшений, зрізи міцно приклеюються до скла без виникнення щілин, так як в цей час починають діяти сили поверхневого зчеплення.

За відсутності термостата для наклейки зрізів можна застосувати металеві або азбестові пластинки, які слід нагріти на полум'ї спиртівки.

Можна досягти гарних результатів, якщо парафінові зрізи, що розташовані на поверхні води на предметному склі, нагрівати зверху електричною настільною лампою з нахиленим рефлектором.

Якщо зрізи погано чіпляються до скла, їх наклеюють спеціально приготованим білком: змією метою звичайно застосовується суміш яєчного білка та гліцерину (1:1). Ми вважаємо, що така кількість білка не сприяє задовільному приклеюванню зрізів до скла, оскільки дистильована вода легко розчиняє компоненти суміші. Згідно з результатами наших спостережень, такий пропис придатний лише відносно досить тонких (3,0-4,0 мкм) зрізів. Якщо їх товщина перевищує 5,0-10,0 мкм – збільшується сила поверхневого натягу між склом та зрізом, внаслідок чого зріз відпадає. У зв'язку з цим ми рекомендуємо збільшити в суміші частку яєчного білка: 3 частини на 2 частини синтетичного гліцерину, в цей час суміш для склеювання додатково зменшує силу поверхневого натягу і, відповідно, приклеює зріз до скла міцніше. Збільшувати ще більше частку яєчного білка у суміші (або користуватися чистим білком) ми не рекомендуємо, оскільки зайва кількість сильно адсорбує барвники: створюється картина погано зневодненого зрізу (рис. 1.11.9.1).

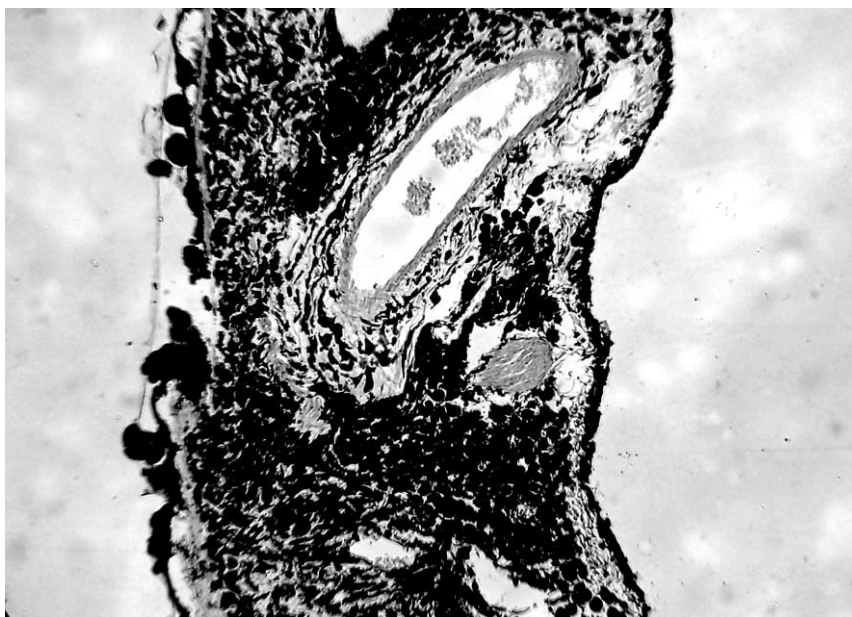


Рис. 1.11.9.1 – Адсорбція еозину білком. 120х

Не рекомендується також застосування для склеювання сумішей «яєчний білок/5% формалін» у співвідношенні 1:1; 2:5; 3:5 тощо. через відсутність вираженого клеючого ефекту.

Рекомендовано до свіжовиготовленою суміші додавати кілька кристаликів тимолу або карболової кислоти, щоб уникнути її загнивання під час зберігання. Наші спостереження показують, що тривале зберігання суміші тільки погіршує її склеювальні властивості, тому доцільно її періодично (не частіше одного разу на три місяці) замінювати на свіжу.

Суміш наноситься на предметне скло рівномірно (маленька крапля добре розтирається попередньо знежиреним кінчиком пальця). Потім, для посилення її склеювальних властивостей, необхідно дещо згорнути білок на середньому полум'ї пропанового пальника і тільки після цього можна починати операцію приклеювання. Згортання білка слід проводити дуже акуратно: нами зазначено, що під час сильного нагрівання скла гліцерин, можливо термічно сепарується і виступає у вигляді маленьких крапельок, що погіршують якість приклеювання.

У літературі є повідомлення про застосування склеювальної суміші, що складається з дистильованої води, водного розчину формаліну та сироватки крові великої рогатої худоби:

- сироватка крові: 15,0 мл;
- дистильована вода: 10,0 мл;
- 5%-й водний розчин формаліну: 6,0 мл

Рідина такого складу може зберігатися тривалий час.

У своїй практичній діяльності ми використовували різні профілактичні сироватки: протипаратифозні, проти бешихи і т.д., в цей час тип сироватки та термін виготовлення суміші істотно не впливали на якість склеювальних властивостей.

Слід зазначити, що застосування сироваткових сумішей має деякі обмеження: альбуміни та глобуліни сироватки сильно адсорбують на своїй поверхні деякі барвники, наприклад, еозин. Якщо склеювальна суміш недостатньо рівномірно розподілена на поверхні предметного скла, найбільш товсті її шари інтенсивно забарвлюються і під час накладання додатково зафарбованого зрізу вони стають схожими на темні плями.

В окремих випадках нами іноді застосовується «сухий» метод, що одночасно поєднує розправлення та наклеювання зрізів. Сутність його полягає в тому, що на предметне скло з склеювальною сумішшю, кладеться нерозправлений зріз, потім скло знизу акуратно підігрівається (рис. 1.11.9.2).



Рис. 1.11.9.2 – Платформа для розправлення зрізів.

Критерієм завершення операції є початок розплавлення ущільнюючого середовища. Потім скло необхідно повільно остудити.

Приклеєні такими способами зрізи досить міцно тримаються у процесі подальшої гістологічної обробки. Це особливо важливо під час подальшого вимивання з них етанолу водою, тому що в цей час вивільняється теплова енергія, яка є причиною відклеювання зрізів.

Існує можливість монтажу зрізів на прожарених скельцях. Наші спостереження показують недоцільність такого підходу: можливо, сила поверхневого натягу між склом і зрізом у цьому випадку є недостатньою для його утримування.

1.11.10 Просушування зрізів

Деякі дослідники звичайно сушать зрізи у парафіновому термостаті за 60-65°C з використанням спеціальних платформ. Ми відзначаємо, що компоненти ніжних тканин за такого методу просушування сильно зморщуються, між ними утворюються широкі щілини; в результаті чого фарбування сполучнотканинного компонента значно погіршується.

Примітно, що висушування за температури, що є на 5-7°C вищою за точку плавлення парафіну сприяє ретельному просочуванню тканинних структур, але воно настільки сильне, що в подальшому видалення парафіну є значно утрудненим (рис. 1.11.10.1).

Додаткові труднощі фарбування таких зрізів викликані також паралельним виникненням у цитоплазмі клітин дрібних парафінових кристалів або артефактів Недцеля (Nedzel J. [49]).

Існує прискорений метод висушування зрізів, попередньо розправлених у 30 – 80% етанолі при кімнатній температурі. Цей метод має суттєвий недолік: зрізи легко можна пересушити, внаслідок чого вони стають крихкими та у ряді випадків відклеюються від скла.

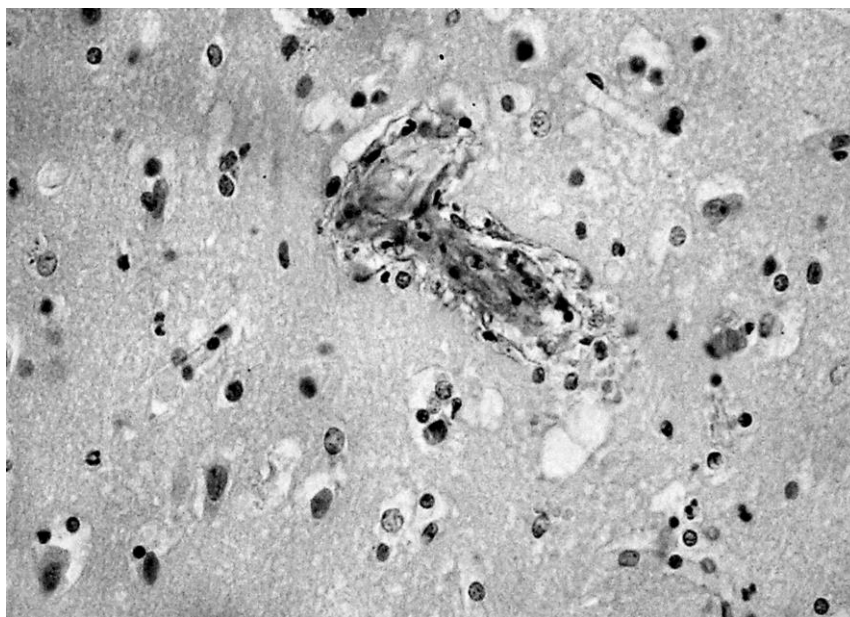


Рис. 1.11.10.1 – Нерівномірність фарбування тканини при недостатньому видаленні парафіну із зрізу. Гематоксилін Гейденгайна, фукселін Харта. 200х

Після завершення монтажу на предметному склі, у деяких випадках ми рекомендуємо сушити зрізи просто на повітрі, при 20-25°C не менше 0,5 години: «пасивне» сушіння, порівняно з термічним і прискореним спиртовим, є дуже ефективним.

1.11.11 Підготовка зрізів до фарбування

Розправлені, змонтовані на скельцях та ретельно просушені зрізи обробляють у відповідних розчинниках парафіну. Методи, що для цього використовуються варіюють в залежності від способів різання, фарбування та укладання зрізів.

Парафінові (парафін-целоїдинові) зрізи звичайно спочатку нагрівають дещо вище температури плавлення парафіну (до 57-58°C), а потім занурюють в О-ксилол для його розчинення (Nedzel J. [49]).

Ми пропонуємо видаляти частину парафіну зі зрізів шляхом нетривалого витримання скелець у нахиленому положенні у термостаті: парафін в цей час з них стікає.

Під час депарафінування ненагрітих зрізів у холодному О-ксилолі, зрізи можуть звільнитися від парафіну у повному обсязі. Ми також вважаємо, що зрізи слід попередньо нагрівати, проте їх треба витримати в О-ксилолі дещо довше (в цей час розчинник необхідно двічі-тричі змінити, щоб перенести парафін у наступний розчин). Доцільність такого підходу можна пояснити тим, що охолодження парафіну відбувається набагато швидше, ніж розчинник встигає видалити його зі зрізу. В цей час утворюються кристали з подвійним променезаломленням. Артефакти утворюють у цитоплазмі клітини дрібнодисперсну емульсію, яка під час фарбування гематоксиліном Гейденгайна та жировим червоним «О» надає їй грубої зернистої структури (рис. 1.11.11.1).

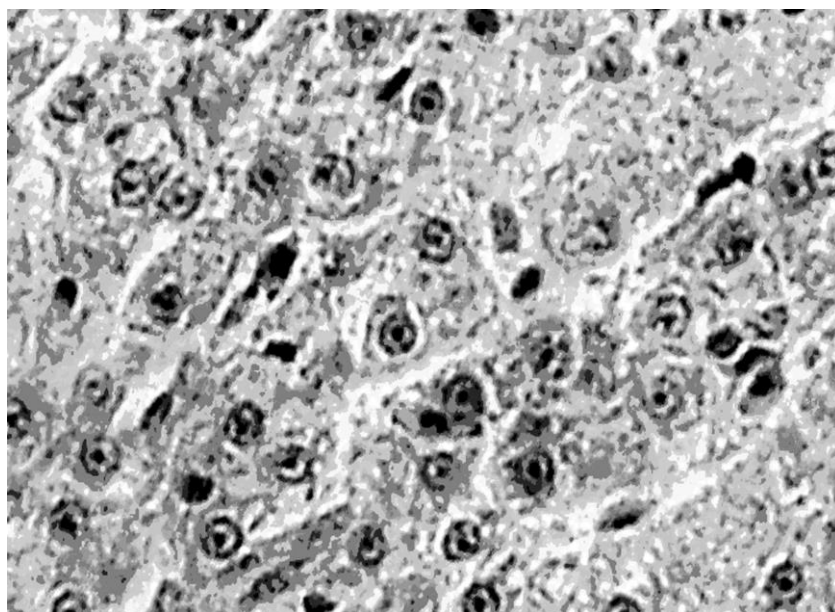
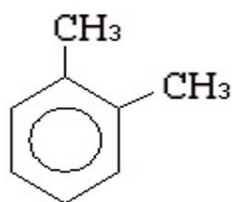


Рис. 1.11.11.1 – Парафінові артефакти у гепатоцитах.

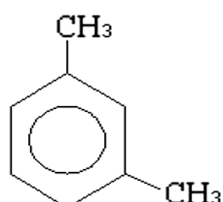
Гематоксилін Гейденгайна, жировий червоний «О», імерсія. 900х

Такі зрізи здаються каламутними і часто є непридатними для спостереження при великих збільшеннях мікроскопу.

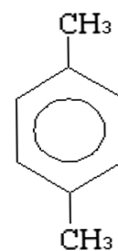
Як було зазначено в п. 1.5, гарним розчинником парафіну є ксилол (див. табл. 1.4). Доведено залежність розчинних властивостей ізомерів ксилолу (диметилбензолу) від особливостей просторової структури їх молекул (рис. 1.11.11.2).



1,2-диметилбензол
(*орто*-ізомер)



1,3-диметилбензол
(*мета*-ізомер)



1,4-диметилбензол
(*пара*-ізомер)

Рис. 1.11.11.2 – Просторова структура молекул ізомерів
диметилбензолу

Як видно з рисунка, заміщувачі (CH_3) у молекулі орто-ізомеру знаходяться близько один до одного (положення в бензольному ядрі – 1, 2). Така особливість визначає хороші якості розчинника: у разі неповного видалення парафіну зі зрізу, клітини задовільно проглядаються за великих збільшень мікроскопа (рис. 1.11.11.3).

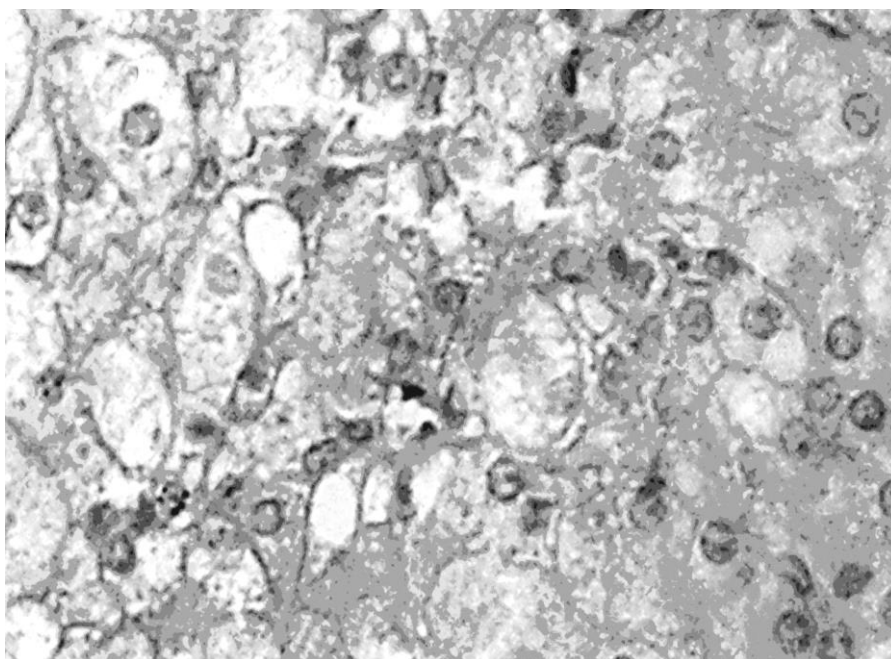


Рис. 1.11.11.3 – Парафінові артефакти у гепатоцитах: обробка зрізу Оксисолом. Товщина зрізу – 3,0 мкм. Гематоксилін Гейденгайна, жировий червоний «О», іммерсія. 900х

Оскільки під час звільнення зрізів від парафіну візуально проконтролювати появу артефактів практично неможливо, з метою повного їх видалення ми рекомендуємо провести наступні операції:

1. Після проведення через другу або третю зміну О-ксилолу зріз нагріти до 60-65°C;

2. Зріз провести через додаткову зміну О-ксилолу*.

Примітка. *Додаткова зміна розчинника рекомендована лише в тому випадку, якщо зріз досить товстий (10,0-15,0 мкм).

Як показує наш досвід, нагрівання зрізу майже завжди сприяє видаленню парафінових артефактів на 75-85%.

Пара-мета-ізомери ксилолу, внаслідок віддаленого розташування замісників (CH_3) у бензольному ядрі (1,3 та 1,4-положення), є гіршими розчинниками парафіну, внаслідок чого до застосування у гістологічній техніці не рекомендуються (рис. 1.11.11.4) .

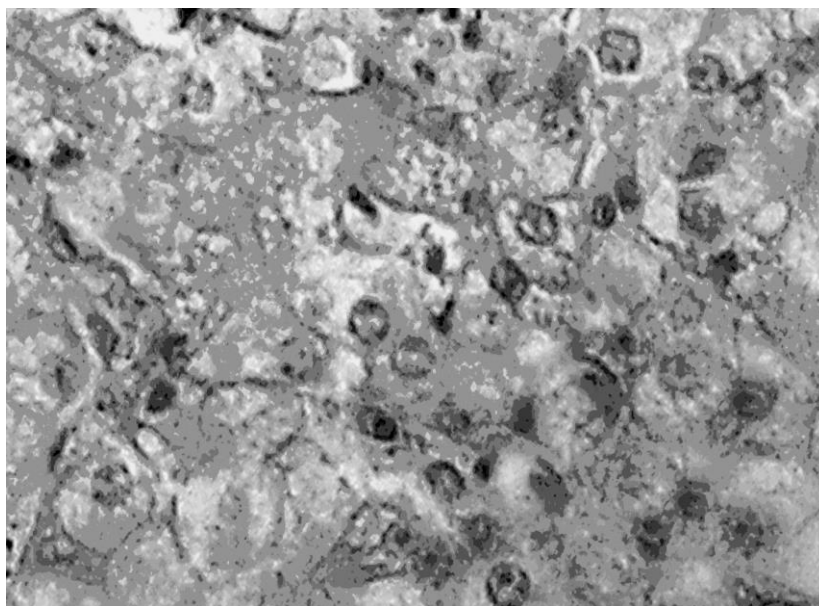


Рис. 1.11.11.4 – Парафінові артефакти у гепатоцитах: обробка зрізу П-М-ксилолом. Товщина зрізу – 3,0 мкм. Гематоксилін Гейденгайна, жировий червоний «О», іммерсія. 900х

У зв'язку з існуючою проблемою повноти видалення парафінових артефактів, ми провели пошук найбільш ефективних розчинників парафіну. Хороші результати були отримані при використанні діоксану, або 1,4-

діетилендіоксиду ($C_4H_8O_2$) та псевдо-кумолу ($C_6H_5(CH_3)_3$). Оскільки діоксан є надзвичайно гігроскопічним і токсичним, псевдо-кумол може бути рекомендований до використання у гістологічній техніці як альтернативний розчинник парафіну (рис. 1.11.11.5).

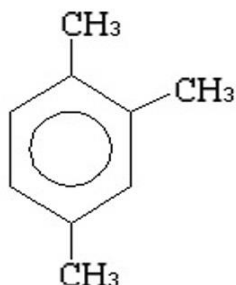


Рис. 1. 11.11.5 – Структурна формула псевдо-кумолу

Як видно з рисунка, псевдо-кумол поєднує в собі властивості 1,2-диметилбензолу та 1,4-диметилбензолу: моливо, у даному випадку має місце синергізм хімічних властивостей розчинника (рис. 1.11.11.6).

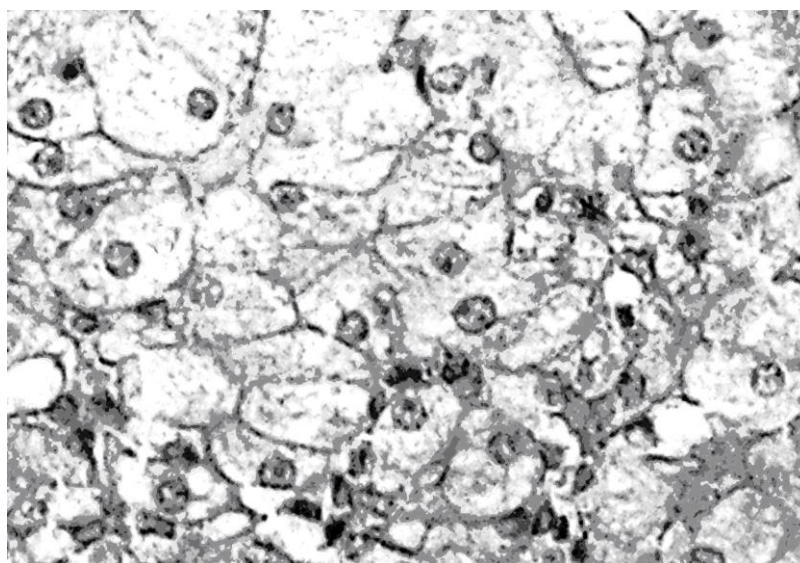


Рис. 1.11.11.6 – Парафінові артефакти у гепатоцитах: обробка зрізу псевдо-кумолом. Товщина зрізу – 3,0 мкм. Гематоксилін Гейденгайна, жировий червоний «О», іммерсія. 900х

Ступінь видалення парафіну визначає прозорість гістологічного зрізу, тобто можливість спостереження при великих збільшеннях мікроскопа. Критерієм повноти видалення ущільнюючого середовища є здатність мікропрепарату пропускати промені світла (табл. 1.11.11.1).

Таблиця 1.11.11.1 – Залежність прозорості гістологічних зрізів крайової зони печінки від їх товщини та ступеню видалення парафіну*

Товщина зрізу, мк	Розчинник парафіну		
	П-М-ксилол	О-ксилол	Псевдо-кумол
	Сила світлового потоку, Лк		
8	9	21	32
7	12	24	36
6	14	26	41
5	16	27	50
4	19	29	55
3	22	33	58
2	25	38	64

Примітка. * В експерименті були використані матеріали та обладнання:
люксметр «LUX-21-SM», Бельгія;
світловий мікроскоп «BIOLAR», Польща:
об'єктив PZO-100-OI,
окуляр PZO-8-K,
конденсор PZO-IRIS,
світлофільтр комбінований ФГПМ-2,5х,
освітлювач «LINVATEC-2», США;
олія імерсійна ISO 8036/1, «GARGILLE», США;
барвники: гематоксилін Гейденгайна, жировий червоний «О».

Як видно з таблиці, показники проникності 2,0-х мікронних зрізів гепатоцитів, знепарафінованих псевдо-кумолем, значною мірою відрізняються від проникності зрізів, оброблених іншими розчинниками (2,56 і 1,68 рази відповідно). Оскільки гепатоцити печінки білуги мають досить великі розміри (6,0 х 4,0 мкм), виконання дуже тонких зрізів необов'язкове.

Слід зазначити, що дані таблиці лише приблизно відбивають повноту видалення з клітин артефактів Недцеля. На практиці мають місце випадки, що додатково «спотворюють» мікроскопічну картину:

- малі розміри клітин;
- гіперхромність ядер;
- гіперхромність колоїдних структур цитоплазми;
- гіперхромність включень.

Таким чином, під час роботи з лімфоїдною, ембріональною та деякими іншими типами тканин, слід виконувати наступні правила:

- виконання зрізів товщиною 2,0-3,0 мкм;
- знепарафінування зрізу за допомогою псевдо-кумолу;
- виконання фарбування «м'яко» фарбуючими розчинами гематоксиліну та еозину.

Такий комплексний підхід дозволяє суттєво підвищити якість зрізів (рис. 1.11.11.7).

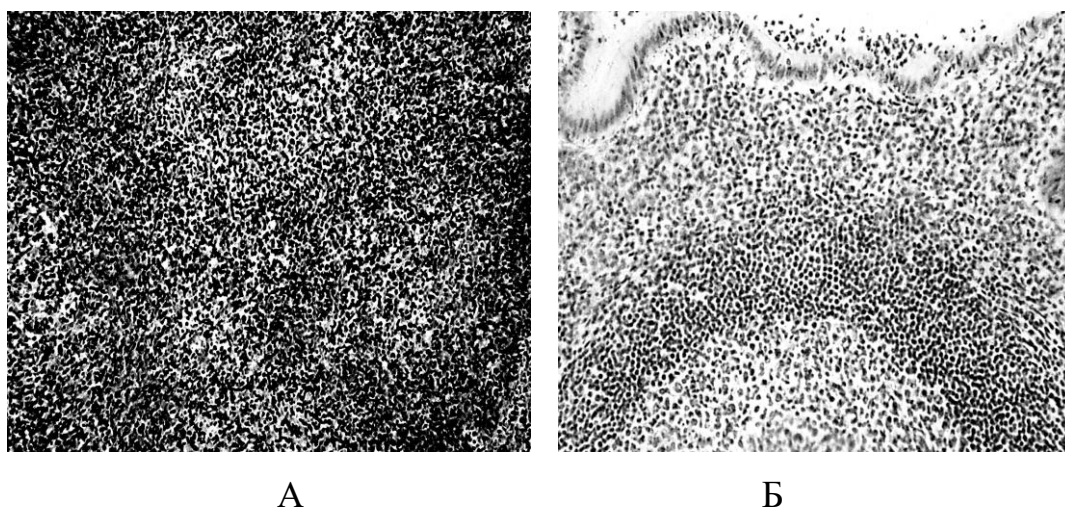


Рис. 1.11.11.7 – Залежність якості зрізу лімфоїдної тканини від його товщини, способу знепарафінування та забарвлення.

А – товщина зрізу – 5,0 мкм, обробка О-ксилолом. Гематоксилін Бемера, спиртовий (2%) еозин. 400х. Б – товщина зрізу – 2,0 мкм, обробка псевдо-кумоллом. Гематоксилін Гейденгайна, водний (1%) еозин. 400х

Як видно з рисунка, чим тонший зріз і чим повніше з нього видалений парафін, тим якісніша наводненість зрізу, тобто його підготовка до фарбування. Доведення зрізів до води відбувається шляхом витіснення О-ксилолу двома змінами 96% етанолу з подальшим його вимиванням (цю операцію потрібно проводити дуже обережно, так як при з'єднанні спирту і води відбувається екзотермічна реакція). Ми відзначаємо, що застосовувати 100%-ий етанол необов'язково: кількість води, що викликає помутніння рівних частин зневоднюючого та просвітлюючого агентів, становить 12-14% (або 8-10% стосовно 96% етанолу), що є допустимим.

Перед витісненням О-ксилолу доцільно проконтролювати якість освітлення, зріз попередньо проглядається на чорному тлі. Якщо в цей час він не є абсолютно прозорим, то в ньому присутня вода. У цьому випадку зріз обробляють однією зміною 96% етанолу (до повного зневоднення), потім повторно однією зміною О-ксилолу і 96% етанолу. Після завершення цих операцій зріз можна фарбувати.

Крім парафінових осадів у зрізах часто трапляються формалінові осадки («формаліновий пігмент»). Найбільш простим і надійним засобом для їх видалення є 1-2%-й розчин їдкого лугу (KOH) на 50-70%-му спирті; можна користуватися простим водним розчином KOH, виготовленим на дистильованій воді. Обробка зрізів розчином лугу триває трохи більше 3-5 хвилин, далі слідує промивання у водопровідній воді протягом 15-30 хвилин. Ми відзначаємо, що такий спосіб ефективний лише щодо заморожених зрізів, оскільки парафінові зрізи у присутності лугів негайно відстають від предметного скла.

Для парафінових зрізів ми рекомендуємо більш слабкий спиртовий розчин лугу, що є сумішшю $1,0\text{ см}^3$ 1,0%-го водного розчину KOH з $100,0\text{ см}^3$ 70-80%-го етанолу (рідина Верокая). Попередньо знепарафіновані зрізи обробляються цією рідиною протягом 10-15 хвилин, промиваються у проточній воді 3-4 хвилини, потім фарбуються.

Примітно, що рідина Верокая за своїм ефектом поступається міцнішим лужним розчинам і задовільні результати дає лише при виділенні невеликої кількості формалінових осадів; застосовувати її можна і на заморожених зрізах.

Майже повного видалення «формалінового пігменту» нам вдалося досягти шляхом нагрівання зразків тканини до 60-62°C, в процесі їх заливання у парафін: можливо, саме ця температурна межа сприяє термічному розкладанню осаду.

Існує можливість успішного забарвлення недепарафінованих зрізів: для цього їх необхідно витримати протягом 18 год. у 2%-му розчині анілінового синього, 0,05%-му розчині толуїдинового синього, 2%-му розчині метиленового синього, 0,5%-му розчині гематоксиліну за Балардом і т.п.). Під час використання цього методу фарбування спотворення гістологічних структур значно зменшується. Після завершення процедури надлишок фарби видаляється водою або спиртом, потім зрізи сушать, звільняють від парафіну і укладають.

Під час фарбування недепарафінованих зрізів слід уникати нагрівання до температури, близької до температури плавлення парафіну, тому що при цьому у зрізах утворюється непроникна для барвника плівка.

Результати, отримані нами під час використання цього методу, не узгоджуються з результатами, отриманими Gresnich H.G. [33]. Очевидно, фарбу сприймають лише погано зневоднені і неякісно залиті у парафін зрізи. Слід відмітити, що «холості», тобто позбавлені об'єкта зрізи зовсім не фарбуються навіть після тривалої витримки у барвнику. Це є доказом того, що парафін та просочені ним тканини не сприйнятливі ні до водних, ні до спиртових розчинів барвника.

1.11.12 Фарбування зрізів

Мета фарбування у мікроскопічній техніці полягає в тому, щоб різні компоненти клітин і тканин, а також екзогенні матеріали виявлялися більш виразно: у ряді випадків фарбування обумовлене так званою «адсорбцією» барвника тканинними структурами.

Для досягнення бажаного результату звичайно використовують один або комбінацію декількох барвників одночасно або послідовно, щоб виявити більше тканинних елементів під час фарбування у додаткові кольори. Звичайно не існує певного загального методу, що дозволяє найкраще виявляти всі елементи тканини одночасно. Тому, розроблені та успішно застосовувані методи, за якими можна диференційовано забарвлювати до чотирьох компонентів (спеціальні методи фарбування еластину та колагену виявляють також ядра та цитоплазму).

В теперішній час, в залежності від мети дослідження гістологами застосовується досить великий арсенал барвників, однак у повсякденній практиці їх кількість зведена до мінімуму (Grecnich H.G. [33], Tschirch A. [62]). Більшість дослідників отримують про тканини лише орієнтовні уявлення – без виявлення особливих елементів клітин та тканин: сутність такого методу полягає лише у фарбуванні ядра, меж клітин та цитоплазми – в цей час завжди необхідно враховувати здатність тканини до фарбування (Erlich E. [27]).

Вважають, що щільні тканини вимагають тривалого забарвлення; пухкі – навпаки. Ми вважаємо, що керуватися виключно цим підходом не можна. Для досягнення оптимального ефекту фарбування необхідно підібрати пропис барвника відповідно до структур тканин та їх особливостей його адсорбувати, щоб, за можливістю, уникнути регресивного фарбування. Сутність процесу у тому, що зріз фарбується не оптимально (прогресивно), а перефарбовується. Надалі його слід диференціювати, тобто позбавити від надлишку барвника: це може негативно позначитися на подальшій здатності тканини сприймати барвник.

Відомо, що оптимальний ефект фарбування тканин досягається індивідуальним підбором типу та пропису барвника (а за необхідності також його концентрації у розчині). Так, для фарбування меж та ядер клітин часто застосовують гематоксилін ($C_{16}H_{14}O_6$) за різними прописами або кислий гемалаун Майєра. Ці барвники дають хороші результати лише у разі тонких, дещо більших за 4 мкм зрізів. У пофарбованих клітинах добре проглядаються

тонкі структури ядра, що робить можливим проведення цитологічних досліджень. В інших випадках, особливо якщо необхідно отримати контрастне забарвлення для отримання якісних мікрофотознімків, застосовують як гемалаун Майєра, так і кислий гематоксилін (табл.1.11.12.1).

Таблиця 1.11.12.1 – Прописи для приготування 1,0 л гемалауну та кислого гематоксиліну*

Компоненти барвника	Гемалаун Маєра	За Вейгертом	За Гейденгайну	Кислий Ерліха	За Бемером- Шморлем
гематоксилін	1 г	0,5 г	0,5 г	6,4 г	5 г
протравма	-	1,5 – 4,0% водний розчин залізних галунів	2% водний розчин залізних галунів	-	-
алюмо-амонієві галуни	50 г	-	-	40 г	100 г
етанол	-	-	-	322 мл	60 мл
гліцерин	-	-	-	322 мл	-
вода	1000 мл	-	-	322 мл	1000 мл
окисник, що використовується для визрівання	NaIO ₃ , 0,2	-	-	-	-
час	миттєво	свіжо приготований	свіжо приготований	6 – 8 тижнів	8 діб
температура	15°C	15 – 20°C	15 – 20°C	15°C	15°C
можливий варіант для прискорення визрівання	-	-	-	NaIO ₃ , 0,64г	аеронізація повітря

Продовження таблиці 1.11.12.1

час	-	-	-	миттєво	2 – 6 тижнів
температура	-	-	-	15°C	23°C
додана кислота	лимонна, 1,0 г	1,5 – 4,0% водний розчин залізних галунів	2,5% водний розчин залізних галунів	уксусна, 32 мл	-
стабілізатор	хлоралгідрат, 50 мл	-	-	-	саліцилова кислота
встановлений час зберігання	2 – 3 місяці	2 – 3 місяці	3 – 4 місяці	декілька років	від декількох місяців до року

Примітка: *Рекомендується додавати гліцерин і кислоту після того, як визрівання закінчене повністю.

Кількість гематоксиліну у всіх прописах є приблизною, оскільки вміст чистого гематеїну у порошку може коливатися від 85 до 100%, в цей час якість порошку під час тривалого зберігання значно знижується (гарантійний термін зберігання гематоксиліну становить близько 5 років).

Існує можливість посилення інтенсивності забарвлення ядер клітин у 1,5-2 рази за рахунок підвищення температури розчину для фарбування. Ми вважаємо, що таким прийомом слід користуватися з великою обережністю: під час підвищення температури інтенсивність фарбування звичайно не підвищується, а падає внаслідок термічного розкладання компонентів барвника. В цей час межі клітин та ядра набувають слабокоричневого або рожевого відтінку замість інтенсивного синього або фіолетового. З метою посилення насиченості відтінку кольору пофарбованих органоїдів ми рекомендуємо не підвищувати температуру розчину барвника, а дещо посилити реакцію

«підсинення», тобто. реакцію взаємодії адсорбованого тканиною гематоксиліну (гемалауну) і 1% нашатирного спирту.

Іноді необхідний ефект досягається тривалим промиванням (до кількох годин) гістологічних зрізів у водопровідній воді, яка має слаболужну реакцію. Ми отримуємо набагато кращі результати, додаючи 8-10 крапель 5% розчину нашатирного спирту в 200,0 мл води: в цей час інтенсивне посиніння відбувається майже миттєво.

Набагато частіше та успішніше для прогресивного фарбування ядер та клітинних кордонів ми використовуємо кармін ($C_{22}H_{20}O_{13}$). Перевага цього барвника полягає в тому, що під час обробки досить товстих (8,0-12,0 мкм) зрізів мікроскопічна картина залишається виразною та придатною до біометричної обробки: кармін практично не забарвлює цитоплазму.

Перевага використання спиртових розчинів карміну є очевидною, оскільки їх барвники сильніше водних. На нашу думку, пропис Майєра є одним із найкращих. Склад розчину карміну за цим прописом наступний:

- кармінова кислота: 1,0 г;
- хлористий алюміній: 0,5 г;
- хлористий кальцій: 4,0 г;
- 70%-й етанол: 100,0 мл;
- саліцилова кислота: 0,2 г.

Загальний час фарбування: 15 – 30 хв.

Апробація пропису Майєра та подальше порівняння результатів власних досліджень з результатами, отриманими іншими авторами, показали, що в усіх випадках ядра клітин на забарвлених зрізах проглядаються не зовсім виразно (рис.1.11.12.1).

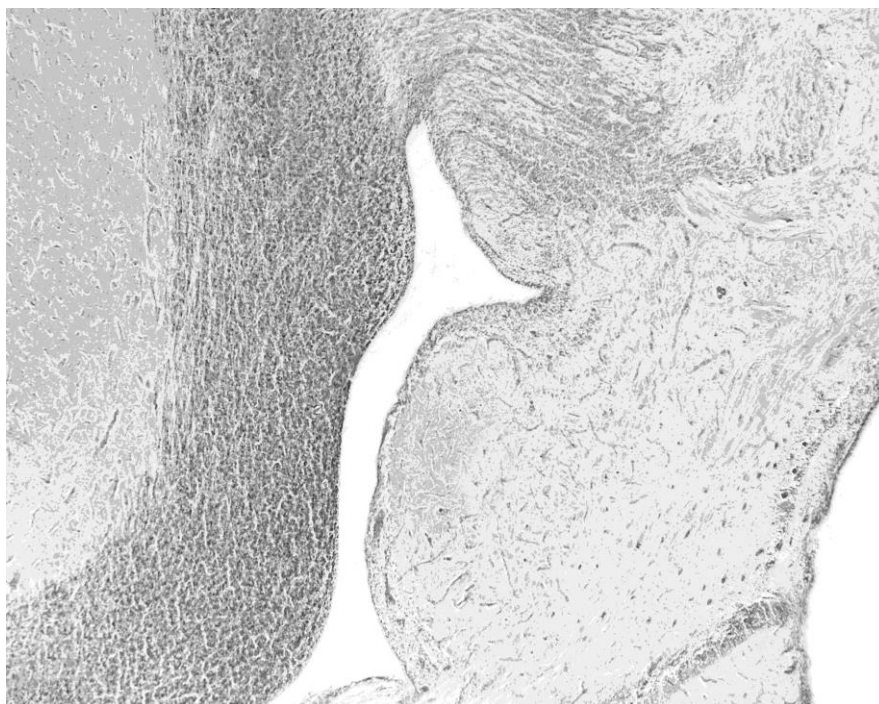


Рис. 1.11.12.1 – Фрагмент середнього мозку. Кармін Майєра. 100х

Дослідним шляхом доведено, що незначне підвищення вмісту основних компонентів у розчині барвника призводить до посилення його барвників, цьому значною мірою також сприяє заміна 70%-го етанолу на його ректифікат. Таким чином, модифікований нами пропис спиртового карміну Майєра має наступний склад:

- кармінова кислота: 2,0 г;
- хлористий алюміній: 1,0 г;
- хлористий кальцій: 4,5 г;
- 96%-й етанол: 100,0 мл;
- саліцилова кислота: 0,5 г.

Загальний час фарбування: 5 – 7 хв.

Перед використанням ми рекомендуємо розчин барвника двічі профільтрувати, оскільки взаємодія надлишку хлористого алюмінію з карміновою кислотою призводить до випадання дрібнодисперсного осаду.

Слід зазначити, що спиртовий розчин карміну у нашій модифікації забарвлює ядра та межі клітин з однаковою інтенсивністю, що є позитивною

якістю та вигідно відрізняється від результатів забарвлення за Майєром (рис. 1.11.12.2).

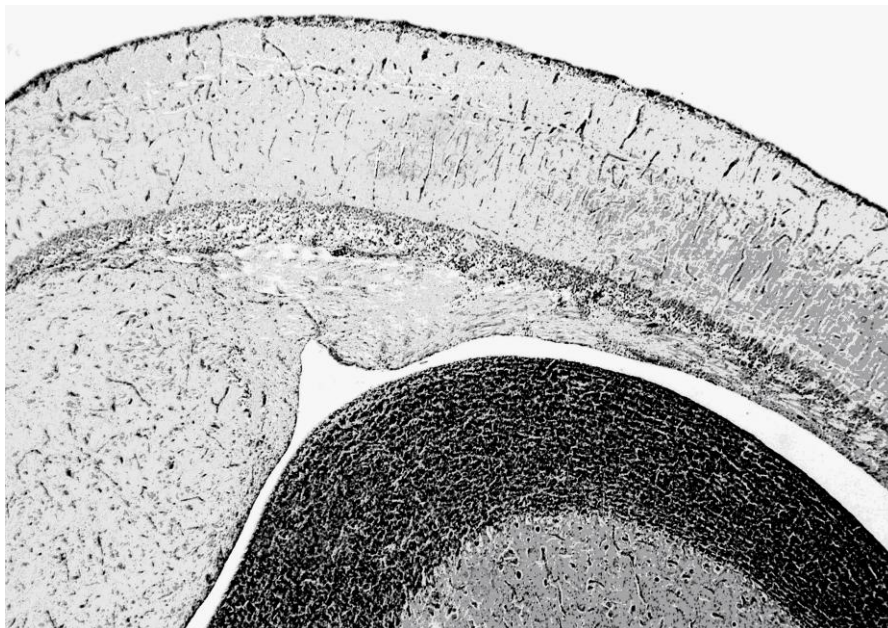


Рис. 1.11.12.2 – Фрагмент середнього мозку. Кармін Майєра, у нашій модифікації. 100х

Якщо є необхідність більш інтенсивно зафарбувати лише ядра, до розчину слід додати 2,0-2,5% крижаної оцтової кислоти.

Запропонований барвник ядер і меж клітин простий у виготовленні, недорогий, дозволяє досить швидко забарвлювати гістологічні зрізи (в середньому у 4 рази швидше, ніж кармін Майєра); результати забарвлення перевершують оригінальні.

Для отримання дуже гарного забарвлення ядер можна використовувати основні анілінові барвники: сафранін «О» (№50240), янус зелений «В» (№11050), і синій толуїдиновий «О» (№52040), у вигляді 0,1-1,0% розчинів у 0,5-1,0% водній оцтовій кислоті (або 0,01 н. НСІ) протягом 5-30 хв. Забарвлення ядер в цей час є дуже вибіркоким і подальше диференціювання не потрібне. Ми також вважаємо за краще фарбувати розчинами такої ж концентрації, але не в дистильованій воді, а в 20-30% етанолі (з метою запобігання росту плісняви під час подальшого зберігання розчину). Слід пам'ятати, що зрізи, зафарбовані основними аніліновими барвниками, мають

вкрай низьку світлостійкість і знебарвлюються протягом 1-2 місяців: дослідження мікропрепаратів та їх мікрофотографування необхідно проводити якомога швидше.

Забарвлення цитоплазми найчастіше здійснюється за допомогою 1% водного або спиртового розчинів еозину Y (AR-87) або еозину B (AR-91). В цей час потрібно пам'ятати, що спиртові розчини фарбують набагато інтенсивніше водних. В усіх випадках фарбування відбувається миттєво.

Під час фарбування тканин корисно пам'ятати правило: «Краще перефарбувати гематоксиліном, ніж еозином». Надлишок еозину важко видалити зі зрізів, тому доцільно індивідуально підібрати концентрацію робочого розчину у відповідності до ступеня сприйнятливості об'єктом дослідження. Ми відзначаємо, що ембріональний матеріал та тканини пухкої консистенції інтенсивно адсорбують еозин, у зв'язку з чим його концентрація не повинна перевищувати 0,2-0,3% у спиртовому розчині. Щільні тканини рекомендовано фарбувати більш концентрованими (1-2%) розчинами.

На особливу увагу заслуговує застосування пікринової кислоти, або 2,4,6-тринітрофенолу ($C_6H_2(NO_2)_3OH$). У поєднанні з гематоксиліном та іншими основними барвниками її можна застосовувати як простий цитоплазматичний барвник.

Застосування інших гістологічних барвників обґрунтоване метою досліджень: під час отримання якісних мікроскопічних оглядових знімків, а також з діагностичною метою ми використовуємо комплексні барвники: азур-еозин і реактив Цинзерлінга.

Метод з азур-еозином включає комплексне фарбування такими барвниками, як еозин (флоксин) і метиленовий синій за Малорі, і нейтральними барвниками, які являють собою суміші азурів з еозином (останні готують безпосередньо перед фарбуванням або заздалегідь, в метанолі або гліцерині). Ми відзначаємо, що немає потреби у виготовленні компонентів та подальшому складанні суміші: у продажу є вже готові до використання реактиви. З відомих сумішей (Малорі, Гімза, Лілі-Пастернака тощо) на українському ринку

найбільш популярною є рідина Романовського. Цей реактив дозволяє забарвлювати ядра та цитоплазму клітин одночасно, в цей час результат забарвлення – високодиференційований (рис. 1.11.12.3).

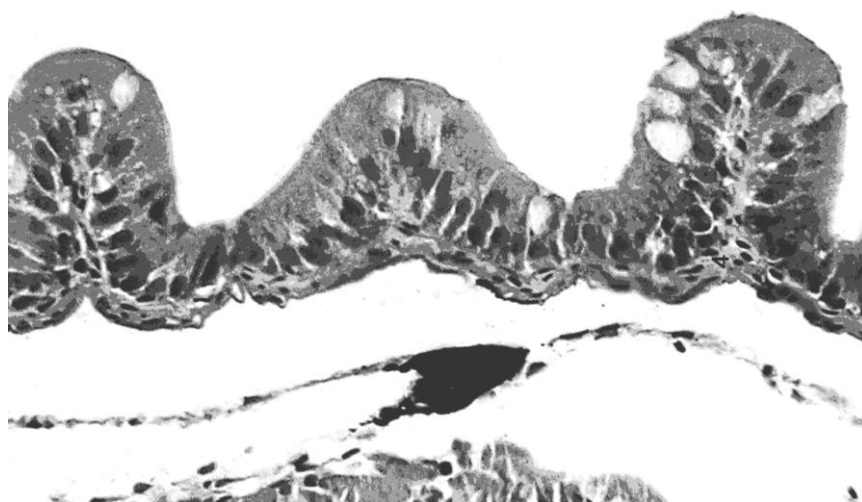


Рис. 1.11.12.3 – Тонкий кишечник. Рідина Романовського (азур-еозин).

300x

Найкращі результати одночасного диференційованого фарбування можна отримати, застосовуючи реактив Цинзерлінга (рис. 1.11.12.4).

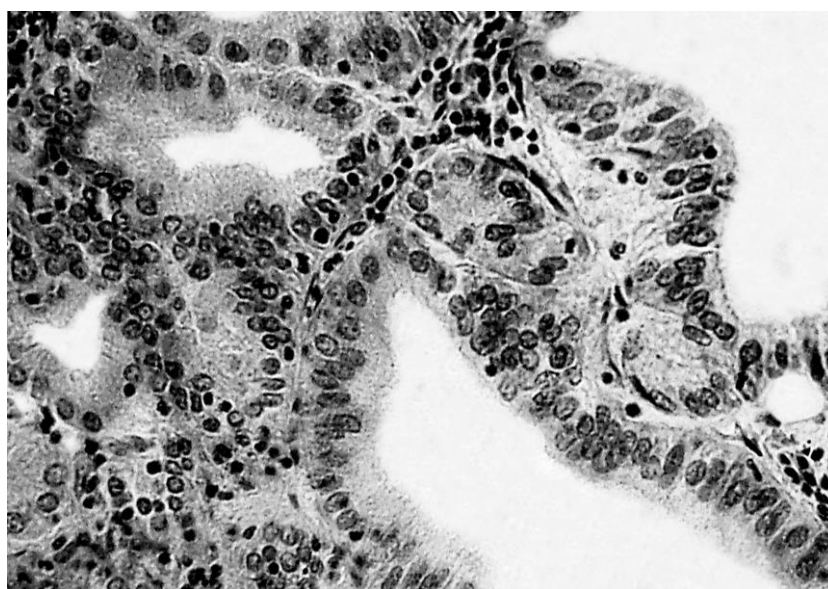


Рис. 1.11.12.4 – Фрагмент слизової оболонки товстого кишечника.

Реактив Цинзерлінга. 400x

Спосіб приготування барвника такий: до 10,0 мл дистильованої води додати 2 краплі 2% спиртового розчину сірчаноокислого фуксину і 6 крапель 1% водного розчину метиленового синього (хромосмону). Реактив профільтрувати та зберігати у темряві за кімнатної температури 4-6 місяців.

Існує безліч модифікацій реактиву Цинзерлінга, проте суміші, виготовлені за різними прописами, дають практично той самий результат забарвлення: ядра – синьо-фіолетові; цитоплазма – яскраво-червона або малинова; хрящ – синій; колаген – червоний.

Найкращий ефект селективного фарбування має реактив Цинзерлінга, що складається з метиленового синього Льофлера і фукселіну Харта у нашій модифікації: з метою посилення інтенсивності гами кольорів та прискорення процесу фарбування, ми рекомендуємо концентрацію кожного компонента суміші збільшити в 1,5-2 рази (рис. 1.11.12.5).

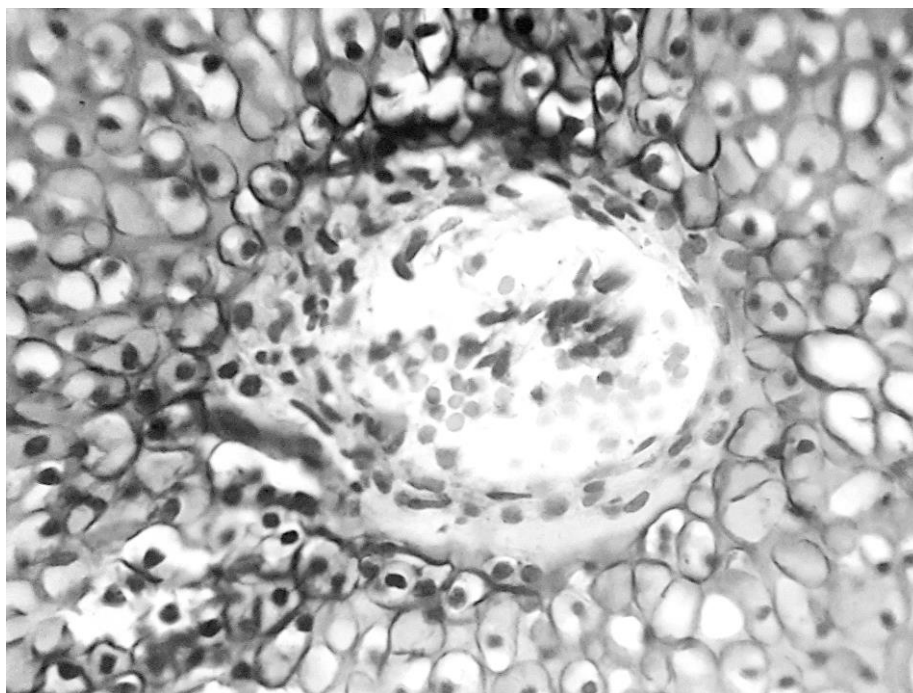


Рис. 1.11.12.5 – Інтеркалярний хондрогістогенез. Реактив Цинзерлінга, у нашій модифікації. 100х

Нами рекомендовано наступний склад розчину барвника:

- метиленова синь Лефлера: фукселін Харта: (у модифікації)*
- хромосмон, насичений розчин;

- фуксин основний, 2,0 г; на 96-100% етанолі, 30,0 мл;
- резорцин, 4,0 г,
- 0,01% розчин КОН, 100,0 мл
- вода дистильована, 200,0 мл;
- 5% розчин FeCl₃, 25,0 мл;
- 96% етанол, 300,0 мл;
- HCl (конц.), 4,0 мл.

Примітка. *Наведений склад застосовуємо не в чистому вигляді, а в 5%-му розчині у 1% солянокислому спирті.

Фарба придатна для використання протягом трьох місяців, перед застосуванням її необхідно профільтрувати.

Слід зазначити, що метод забарвлення за Цинзерлінгом практично має деякі обмеження. По-перше, усі компоненти суміші дуже добре розчиняються в етанолі і, відповідно, можуть бути вимиті зі зрізів під час підготовки до операції просвітлення. Змити надлишок реактиву можна безводним ацетоном, проте сліди розчинника у зрізі можуть погіршити результат вкладання у полістирол (канадський бальзам). По-друге, слабкоокисла реакція середовищ призводить до швидкого знебарвлення препаратів. Особливо швидко знебарвлюється фукселін Харта, значно повільніше – метиленовий синій Лефлера. Час «стійкості» такого препарату, у порівнянні із зафарбованими азур-еозином Романовського, становить лише 1,5-2 місяці, після чого він стає малопридатним для досліджень.

Якщо забарвлення знебарвилось, зрізи можна пофарбувати знову. Для цього препарати витримують у ксилолі (бензолі, толуолі) від декількох годин до доби, доки не відокремиться накривне скло; в цей час відокремлювати скло примусово в жодному разі не можна, щоб уникнути пошкодження або відставання зрізів. Рекомендовано відразу ж провести препарат через 100%-й етанол, проте ми вважаємо, що спочатку необхідно переконатися у повній відсутності на зрізі середовища; для цього необхідне повторне промивання в

ксилолі. Тільки після цього можна проводити операції зворотного проведення через спирт та фарбування. Аналогічним чином поступають, якщо вже наявний забарвлений зріз необхідно зафарбувати за іншим методом: первинне забарвлення знебарвлюють і видаляють підкисленим 96%-м етанолом, зрізи потім ретельно промивають водою і фарбують за новим методом.

Слід відзначити, що є підстава рекомендувати запропоновану модифікацію реактиву Цинзерлінга як діагностичний реагент: він дозволяє здійснити перевірку об'єктів, що досліджуються, на наявність у них мікроорганізмів, колоній вірусів, скупчень найпростіших, а також некротичних (некробіотичних) вогнищ. Таким чином, якщо тканина інфікована, вона забарвлюється монохромно, в яскраво-малиновий колір. Аналогічно барвник дозволяє швидко виявити трупний матеріал і своєчасно вибракувати його.

З метою спрощення процесу фарбування у гістологічних лабораторіях застосовуються різноманітні конструкції стейнерів (рис. 1.11.12.6).



Рис. 1.11.12.6 – Автоматичний стейнер для фарбування мікропрепаратів.

«Thermo» (Німеччина)

Стейнери дозволяють автоматизувати роботу гістолога – точність виконання програм забезпечується програмуванням часу інкубації у хвилинах та секундах. Незважаючи на позитивні якості, обладнання не передбачає індивідуального фарбування препаратів, тому в невеликих лабораторіях воно майже не застосовується.

G. Kiszely [39] вказує, що дослідження незафарбованого матеріалу найчастіше виявляється дуже корисним, хоча можливості для цього обмежені (рис. 1.11.12.7).

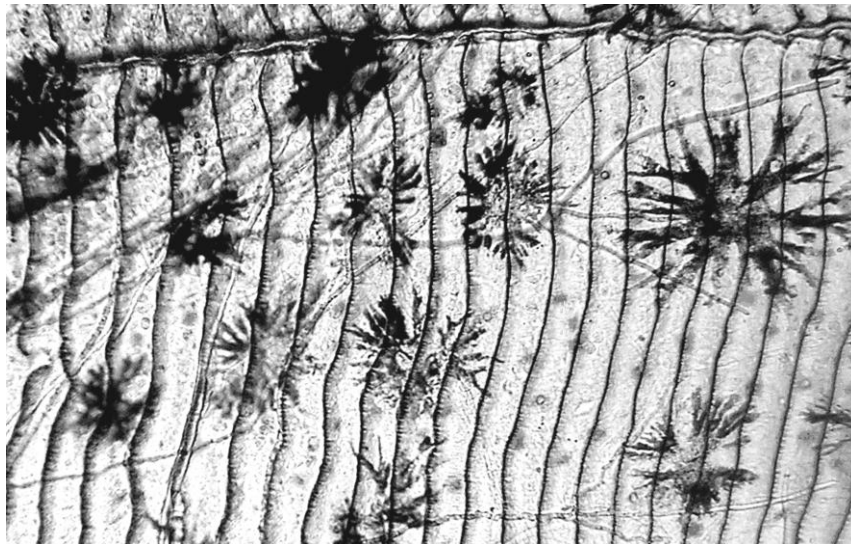


Рис. 1.11.12.7 – Меланоцити. Незабарвлений препарат 120х

Як правило, не фарбують препарати клітин і тканин, що містять пігменти.

1.11.13 Освітлення та укладання зрізів

Зафарбовані препарати ретельно зневоднюються протягом 1 хвилини 96-100% етанолом, потім просвітлюються: просвітлення робить їх однорідними стосовно заломлюваного світла і, відповідно, зручними для мікроскопування.

Розрізняють дві групи речовин для проведення просвітлення в залежності від того, чи здатні вони просвітлювати зрізи відразу після вилучення з води, або тільки після зневоднення їх спиртом. Першу групу речовин складають гліцерин, гліцерин-желатин, насичений розчин вуглекислого калію, фарантова рідина, маса Апаті та ін. Другу групу утворюють ксилол, бензол, толуол, скипідар, ефірні олії, анілінове масло, карбол-ксилол, креозот.

Для повноцінного освітлення Eranko M. [26] рекомендує користуватися карбол-ксилолом. Нами зазначено, що цей реактив суттєво знебарвлює барвники цитоплазми, якщо зрізи у ньому витримуються понад 1,0-1,5 хвилини. Цього недоліку не мають ефірні олії (ориганова, бергамотова, цедрусова), а також анілінове масло і креозот. Pease P. [52] рекомендує користуватися комбінованим способом освітлення: просвітлювати зріз спочатку якоюсь олією або креозотом, та потім змити їх ксилолом. Автор стверджує, що видалення відбувається досить швидко (протягом 0,5-1,0 хв). Наш досвід показує, що вимити оптичну олію повністю із зрізу ксилолом або іншим розчинником дуже важко; залишки олії (креозоту) згодом розбавляють середовище і перешкоджають її полімеризації. Використання ефірних олій є недоцільним також внаслідок того, що більшість із них є коштовними та їх важко знайти.

Заключення зрізів найчастіше проводиться у розчині натуральних або синтетичних смол у відповідних розчинниках; в'язкість таких розчинів невисока, вони легко проникають у тканини та заповнюють простір між предметним та накривним склом.

Відмічено, що в середовищах, приготованих на основі легколетючих розчинників (бензолу або толуолу) під накривними скельцями нерідко утворюються бульбашки повітря в результаті занадто швидкого випаровування розчинника або ж високої концентрації смоли у розчині. Це особливо небажано під час укладання зрізів товщиною 50,0-100,0 мк (овоцитів та вирізки судинного поля ембріонів на ранніх стадіях розвитку). З метою усунення цього дефекту ми пропонуємо використовувати розчинники, що володіють вищою температурою кипіння і, відповідно, меншою леткістю (О-ксилол, °С кип. – 144°C).

Під час вибору середовища важливо враховувати його показник заломлення: якісними вважаються ті середовища, в яких навіть у незабарвлених або знебарвлених препаратах відрізняється більша кількість деталей. Так, якщо різниця між середніми показниками заломлення тканин (1,53-1,54 од.) і середовищ (1,44-1,50 од.) досить велика – 0,06-0,07 од., пофарбований зріз буде

точним і досить контрастним. Якщо ж середні значення показників заломлення середовищ та тканин близькі за своїм значенням, то тканина здається майже прозорою, а в пофарбованих об'єктах дрібні деталі розрізнити важко або майже неможливо.

У гістологічній техніці використовується досить велика кількість різних середовищ, що укладають, проте на практиці воно зведено до мінімуму (табл. 1.11.13.1).

Таблиця 1.11.13.1 – Характеристика смол, що використовуються для укладання

Середовище для заклучення	Клас (хімічна характеристика)	Розчинник і концентрація розчину, С	Показник переломлення, n _D	
			розчину	сухої речовини
натуральна				
канадський бальзам	висушена натуральна смола	О-ксилол, 60	1,5	1,54
			232	47**
бальзам орегонської сосни	рідка натуральна смола	Скипидар, 82	1,5	1,5
			251	07***
каніфоль	висушена натуральна смола	О-ксилол, 70	1,5	1,52
			264	77***
кедрова одлія	рідка натуральна смола	скипидар, 48	1,5	1,52
			030- 1,5151*	62***
синтетична				
синтетичний канадський бальзам	кумароноінденовий полімер	бензол, О-ксилол (1:1), 60	1,5	1,62
			649	05***
полістирол «L- 20025»	полістирол	бензол, 20	1,5	1,61
			150	93**
мінеральна олія	рідка синтетична смола	скипидар,30	1,4	1,48
			60	3**

Примітка: * Імерсійна олія; ** Розрахований за даними для розчину;
*** Отриманий після концентрування розчину.

Кожне з цих середовищ має свої переваги і недоліки. Так, у полістиролу час висихання межі навколо накривного скла становить всього 1 годину, саме ж середовище втрачає свою рухливість через добу. Полістирол доступний і недорогий, але рекомендувати його для повсякденної практики не можна. По-перше, внаслідок кислої реакції у полістиролі швидко вицвітають барвники, особливо еозин, фуксин та сафранін (рис. 1.11.13.1).



Рис. 1.11.13.1 – Вицвітання барвників через 0,5 року у зрізі селезінки, що був укладений в полістирол. 200х

По-друге, якщо цей полімер розчинити в пара-метаксилолі або суміші ізомерів, а не в ортоксилолі (подібна помилка в гістологічній практиці зустрічається не рідко), то через 1,5-2 місяці починається процес швидкої кристалізації середовища внаслідок чого зріз разом з накривним склом відшаровується від предметного скла (рис. 1.11.13.2).

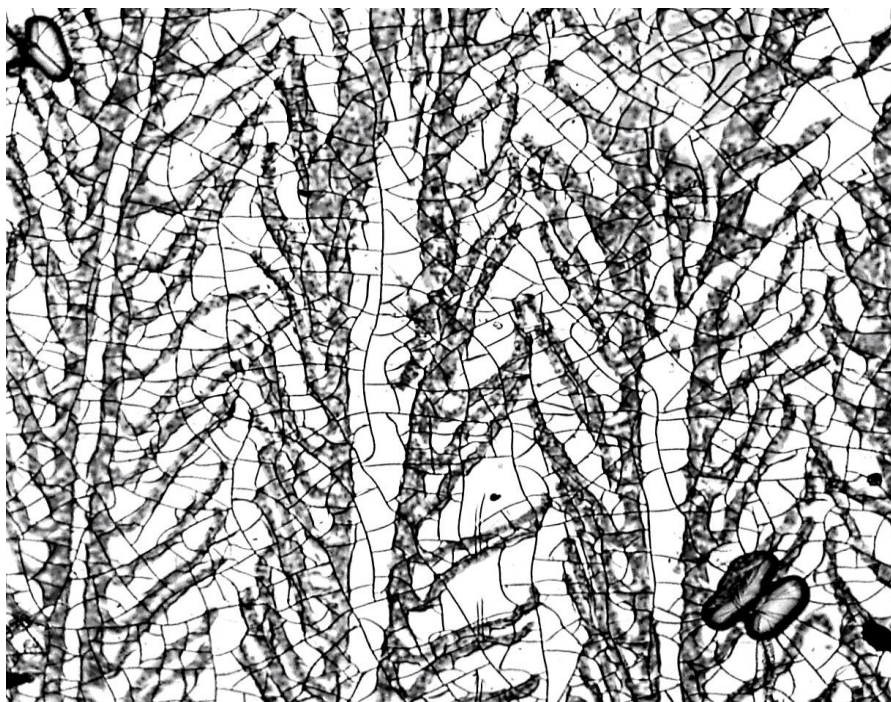


Рис. 1.11.13.2 – Кристалізація та «мозаїцизм» полістиролу. 200х

По-третє, під час швидкої полімеризації полістиролу під накривне скло засмоктуються бульбашки повітря; як зазначалося, цей недолік можна усунути, використовуючи розчинники з нижчою температурою кипіння або додаючи в 100,0 мл розчину полістиролу 5,0-10,0 мл пластифікатора (О-крезилфосфата або дибутилфталата). Ми відзначаємо, що при цьому застигання уповільнюється недостатньо, через 8-9 місяців полістирол кристалізується.

Цих недоліків значною мірою позбавлені канадський бальзам та смола орегонської сосни. Вони розчиняються у багатьох видах органічних розчинників, проте довго сохнуть: навіть за кілька тижнів спостерігається рухливість накривного скла. Разом з тим, як свідчать наші спостереження, мікропрепарати, заключені у ці середовища, зберігаються десятиліття без видимих змін.

Іноді як середовище, що укладає, застосовують деякі сорти каніфолі. Це дуже небажано, оскільки розчини (концентровані, сильно розведені) спочатку швидко кристалізуються, потім відбувається випадання крупнозернистого осаду (рис. 1.11.13.3).



Рис. 1.11.13.3 – Кристалізація каніфолі. 200х

Єдиний сорт – «смичкова каніфоль» може бути рекомендований у клінічній практиці, так як її розчини кристалізуються майже з тією ж швидкістю, що розчин полістиролу з додаванням пластифікатора.

Такі рідкі складові середовища, як кедрова та мінеральна олія довше (до 15-20 років) і набагато краще за інших зберігають цілісність і насиченість кольорової гами барвників, проте на практиці їх застосування дуже рідко. Це пов'язано з тим, що заключені таким чином зрізи необхідно постійно зберігати у горизонтальному положенні, оскільки олії практично не висихають і часто випливають із препаратів: зрізи досить часто доводиться переукладати. У разі невеликої кількості олії між склом можна зробити окантовку з нітроцелюлозного або казеїнового клею, проте такі протектори недовговічні. Під час повторного заключення виникають незручності: клей необхідно розчиняти в ацетоні протягом тривалого часу.

Заклучення зафарбованих заморожених зрізів має особливості. По-перше, ці зрізи досить товсті (25,0-50,0 мкм), у зв'язку з чим завжди здаються дещо перефарбованими. Інтенсивне забарвлення у даному випадку не сприяє виявленню дрібних деталей структур тканин, тому використання середовищ,

які мають показник заломлення понад 1,50 одиниць є небажаним. Для укладання заморожених зрізів нами успішно використовуються водні середовища III класу (за класифікацією Лілі) – гліцерин-желатинові (табл. 1.11.13.2).

Таблиця 1.11.13.2 – Склад та властивості середовищ для укладання, що змішуються з водою

Середовище	Желатин, г	$C_3H_5(OH)_3$, г	$C_{12}H_{22}O_{11}$ (сироп), г	$KCOOH$, г	C_6H_5O Н, г	H_2O	Показник переломлення, n_D	Дифузія метиленового синього
гліцерин-желатин*	8	50	-	-	1	42	1,4164	+++
гліцерин-желатин**	8	50	-	10	1	42	1,4197	+++
гліцерин-желатин***	8	50	-	-	-	42	1,4130	+++
сахароза-гліцерин-желатин****	8	8	50	1	-	33	1,4119	-

Примітка: *У модифікації Малорі; **у модифікації Фріденвальда; ***у модифікації Лілі; ****у модифікації Кайзера.

Гліцерин-желатинові середовища через кілька днів після приготування сильно застигають, тому їх перед застосуванням необхідно розплавляти на водяній бані. Надмірно застигли середовища після тривалого зберігання у холодильнику ($0-5^{\circ}C$), після розплавлення необхідно розбавити. Склад розріджувачів наведено у таблиці 1.11.13.3.

Таблиця 1.11.13.3 – Склад індіферентних середовищ, що використовуються
для розведення

Розчин	Склад розчину, г								
	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Na ₂ CO ₃	NaH ₂ PO ₃	H ₂ O (дист. вода)	C ₆ H ₁₂ O ₆	C ₆ H ₅ OH
фізіол. сольовий	8,5 – 9,0	-	-	-	-	-	1000,0	-	-
Рінгера	8,5	250,0	300,0	-	200,0	-	1000,0	-	-
Л'юїса	8,5	420,0	250,0	-	200,0	-	1000,0	100,0 – 250,0	0,5
Тироде	8,0	200,0	200,0	100,0	1,0	50,0	1000,0	1,0	0,5
Локка	8,5	420,0	250,0	-	200,0	-	1000,0	-	0,5

Якщо немає можливості використання розчину для розведення, замість нього можна використовувати двічі дистильовану воду.

Використання деяких гліцерин-желатинових середовищ для укладання препаратів, пофарбованих метиленовим синім, фукселином Харта або спиртовим розчином основного фуксину є небажаним, тому що під час контакту пофарбованих зрізів з підігрітим середовищем відбувається негайна дифузія барвників. На додаток до цього, R. Mallory [45] повідомляє про руйнівну дію фенолу на препарати, пофарбовані гематоксиліном.

Наш досвід показує, що гліцерин-желатиновим середовищем яке підходить найбільше для укладання заморожених зрізів є суміш у модифікації Кайзера, що містить 50% сахарозу: на відміну від більшості цукрів вона не кристалізується, має відповідні в'язкість і показник заломлення і не вимиває барвники зі зрізів. Підвищувати вміст сахарози у середовищі не рекомендується, оскільки згодом можлива її кристалізація.

1.12 Декальцинація кісткового матеріалу

Гістологічний матеріал, що містить кістку та звапнілі частинки, після фіксації необхідно декальцинувати (Xippel J.M., Gladwinn R.C. [65]). Для цього його проводять через спиртовий ряд, в якому концентрація спирту поступово зростає до 100%, потім знижується у зворотному порядку (70%, 96 та 100% (прискорений спосіб); 60%, 80, 96 та 100% (звичайний спосіб); після цих маніпуляцій об'єкт знову кладуть у воду. Потім матеріал декальцинують 7,5% азотною кислотою яку часто змінюють до його пом'якшення.

Внаслідок своєї слабкої звапнілості, процесу декальцинації кісток молодих особин риб потребує менше часу, ніж у вищих хребетних. В цей час слід пам'ятати, що тривала декальцинація значно погіршує забарвлення ядер та меж клітин. Ми рекомендуємо використовувати 5,0%-й розчин азотної кислоти (50,0 мл: 950,0 мл).

А.Н. Coons [21], I.F. Danieli [22] стверджують, що соляна та сірчана кислоти для декальцинації непридатні. Насправді соляна кислота (3-10%) для декальцинації застосовується рідко.

Ряд досліджень показав, що застосування декальцинуючої суміші наступного складу:

- соляна кислота (концентрована), 50,0 мл;
- хлористий кристалічний натрій, 175,0 г;
- вода дистильована, 1000,0 мл.

дає добрий результат; при складанні суміші необхідно враховувати, що максимально концентрованим розчином хлороводневої кислоти є кислота питомої ваги 12 з 40% вмістом кислоти (за вагою).

Способи декальцинації кісток риб представлені у таблиці 1.12.1.

Таблиця 1.12.1 – Залежність частоти змін та часу декальцинації різних частин скелета від віку

Об'єкт, вік (років)	Частота змін HNO_3 , (5,0%)	Час, год
Кістки черепа*		
1 – 2**	4	1; 2; 2; 2; 1; 1; 1; 1; 1; 2
3 – 4**	7	
Хребці усіх типів		
1 – 2	3	1; 2; 2; 2; 1; 1; 1; 2
3 – 4	5	
Ребра, кістки кінцівок		
1 – 2	3	1; 1; 2; 1; 1; 1; 2
3 – 4	4	
Частота змін $\text{HCL}+\text{NaCL}+\text{H}_2\text{O}$		
Кістки черепа*		
1 – 2**	5	1; 2; 2; 2; 1; 2; 1; 1; 1; 1; 1; 2;
3 – 4**	8	2
Хребці усіх типів		
1 – 2	4	1; 2; 2; 1; 2; 1; 1; 1; 2; 2
3 – 4	6	
Ребра, кістки кінцівок		
1 – 2	5	1; 2; 2; 2; 1; 2; 1; 1; 1; 1; 1; 2;
3 – 4	8	2

Примітка: *У т. ч. кістки щелеп, зуби; **оптимальна температура процесу декальцинації – 25°C; ***оптимальна температура процесу декальцинації – 30°C.

На думку Е.А Kovach [41], після закінчення процесу декальцинації зайву кількість рідини з кісткової тканини слід видалити за допомогою проточної води або етилового спирту. Наш досвід показує, що процедурою промивання у ряді випадків можна знехтувати: наявність у тканині невеликої кількості кислоти не перешкоджають проведенню наступних операцій зневоднення, освітлення та заливання об'єкта в ущільнюючі середовища.

1.13 Підготовка мікрошліфів кісток

У гістологічних дослідженнях з метою визначення віку риб застосовуються гістологічні методики, що дозволяють особливим чином обробляти кістковий матеріал. Вони засновані на укладанні гістологічних об'єктів у щільні середовища з подальшим багатофазовим процесом шліфування та фарбування.

Відомий спосіб підготовки зрізів кісток, який полягає в їх заливці в поліефірну смолу, подальшому розпилюванні отриманої заготовки та шліфуванні поверхні розпилу (Прутько В.Г. [9]). Недоліком цього є те, що на поперечних зрізах нечітко простежуються структурні зони внаслідок вільної орієнтації зразка у заготовці.

Найбільш застосовуваним на практиці є спосіб горизонтальної орієнтації матеріалу у паперовій матриці за допомогою гуміарабіку, заливці в поліефірну смолу, подальшому розпилюванні отриманої заготовки та шліфуванні поверхні розпилу. Недоліком цього способу є заливання в два етапи за рахунок видалення контактного шару гуміарабіку, з подальшою обробкою отриманої заготовки тільки з одного боку.

Поставлене завдання вирішується за рахунок фіксації зразків у паперовій матриці за допомогою подвійного скотчу таким чином, що їх бічна поверхня орієнтована вертикально відносно дна матриці; заливання здійснюється розплавом зуботехнічного восколиту в один етап; після остаточної полімеризації восколиту здійснюють розпилювання та шліфування поверхні заготовки з двох протилежних боків, що передбачає значне зменшення товщини зрізу.

Дослідження були проведені у три етапи: на I етапі дослідження (спосіб 1), матеріал у паперовій матриці був розташований вільно, оскільки фіксатор був відсутній, потім він двічі заливався поліефірною смолою.

На II етапі дослідження (спосіб 2), матеріал, горизонтально зафіксований у паперовій матриці за допомогою гуміарабіку, також двічі заливався поліефірною смолою.

На III етапі дослідження (спосіб 3) послідовність операцій була такою:

1. Зразки досліджуваного об'єкта фіксують вертикально в матриці за допомогою подвійного скотчу так, що бічна поверхня їх була орієнтована вертикально відносно поздовжньої осі матриці;

2. Частини зразків, що виступають над пластичним матеріалом, заливають розплавом зуботехнічного восколіту* і витримують протягом 0,5 год. для повної полімеризації;

3. Після повної полімеризації восколіту отримані заготовки із зразками розпилюють у поперечному напрямку з двох протилежних боків;

5. Отримані зрізи фарбують бромфенолом синім в крижаній оцтовій кислоті з додаванням хлористого амонію та каломелі протягом 3-5 хвилин і промивають проточною водою;

6. Отримані зрізи фарбують 1%-м розчином нінгідрину протягом 3-5 хвилин і промивають проточною водою;

7. Пофарбовані зрізи шліфують абразивами (розмір зерна: 50,0...2,0 мкм).

Примітка. *В якості пластичного матеріалу застосовується зуботехнічний віск виробництва харківського об'єднання «Стома» (ДСТУ 64-2-248-79).

Порівняльна характеристика способів підготовки зрізів кісток представлена в таблиці 1.13.1.

Таблиця 1.13.1 – Ефективність способів підготовки зрізів кісток

Спосіб, з/п	Орієнтація у матриці	Фіксатор у матриці	Середовище для заливання	Кількість етапів заливання	Виготовлення заготовки, год	Обробка заготовки
1	вільна	відсутній	поліефірна смола	2	36,0	з одного боку
2	горизонтальна	гуміарабік	поліефірна смола	2	36,0	з одного боку
3	вертикальна	подвійний скотч	зуботехніч ний восколіт	1	0,5	з двох боків

Як свідчать дані таблиці, заготовка, в яку були залиті матеріали згідно способу 1, для виконання вимагає досить багато часу; обробка заготовки може бути виконана тільки з одного боку, що робить неможливим отримання тонких і якісних зрізів.

Виготовлення заготовки, в яку були залиті матеріали згідно способу 2, також вимагає багато часу за рахунок тривалої полімеризації поліефірної смоли; однобічна обробка заготовки також унеможлиблює отримання якісних зрізів.

Заготовка, виготовлена згідно способу 3, виконується досить швидко і дозволяє отримати досить якісні та тонкі зрізи за рахунок можливості обробки з двох протилежних боків (рис. 1.13.1).

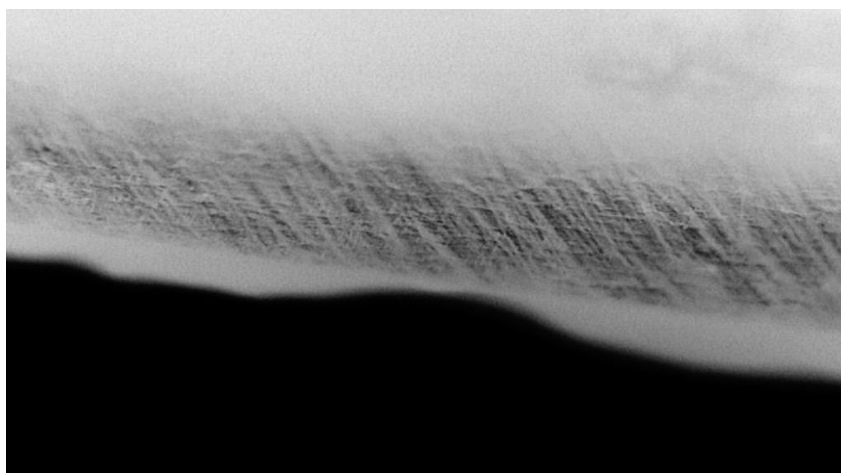


Рис. 1.13.1 – Мікрошліф зуба. Флуоресцеїн, 200х

Порівняно з прототипом, спосіб 3 має такі переваги:

- порівняно недорогий;
- простий у використанні;
- не потребує багато часу;
- дозволяє отримати досить якісні поперечні зрізи кісткового матеріалу.

Економічний ефект від використання запропонованого способу полягає у тому, що замість дорогої поліефірної смоли використовується дешевий зуботехнічний восколīt, який за рахунок швидкої полімеризації дозволяє скоротити час виготовлення заготовки у 72 рази.

РОЗДІЛ II

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для ефективного використання морфофункціональних методів та отримання достовірних результатів, гістологам необхідні дані, що стосуються як окремих методів та його можливостей, а й знання методик їх використання. Відомо, що при існуючому різноманітті прийомів гістологічної обробки, класичні методики не завжди дають позитивний результат щодо тканин ембріонів; дані, які у літературі, неповні, а висновки – суперечливі. Виходячи з цього, нині активно удосконалюються вже описані та багаторазово випробувані методики, на підставі отриманих результатів розробляються інноваційні технології, які надалі впроваджуються у гістологічну практику. Це робить існуючі методики найконкретнішими, результати – достовірними.

2.1 Особливості гістологічної техніки нервової системи

Як показує практика, отримання гістологічних зрізів різних ділянок нервової системи не пов'язане з будь-якими складнощами. Фрагменти головного та спинного мозку, а також периферичної нервової системи чудово фіксуються у будь-якому фіксаторі. Це спростовує усталену думку щодо необхідності застосування як основного фіксатора нервової тканини метилового спирту або безводного ацетону.

Щільність (консистенція) нервової тканини в цілому вважається середньою та подальше ущільнення, що відбувається в процесі фіксації, як правило, позбавляє необхідності додаткового ущільнення за допомогою целоїдину.

Остаточне заливання нервової тканини рекомендовано проводити в парафін-восколітовому середовищі, що, за даними наших спостережень, запобігає стиску ретикулярних структур та передчасному відшаровуванню мозкових оболонок. Крім цього, враховуючи дані лінійних розмірів клітин та інших структурних компонентів нервової тканини, парафін-восколіт є найбільш

відповідним заливальним середовищем для отримання зрізів товщиною 3,0-5,0 мкм.

Необхідно відзначити, що парафін-восколітове середовище придатне для виготовлення оглядових зрізів: при спробі виконання більш тонких зрізів відбувається порушення цілісності ніжних структур, зокрема клітинних контактів та облямівки шлуночкового епітелію.

Різання блоків необхідно виконувати з урахуванням орієнтації мозкових і нервових оболонок у зразку тканини відносно ножа мікротому: спочатку на вістрі повинна потрапляти оболонка, потім власне нервова тканина. Такий прийом обґрунтований тим, що найбільш щільна оболонка в процесі різання зачіпає ніж, відривається і тягне за собою прилеглі фрагменти тканини.

Фіксацію органів чуття можна також проводити будь-яким фіксатором; винятком є око та орган рівноваги (їх бажано фіксувати рідинами, призначеними для обробки ембріональних тканин).

З метою досягнення найкращої безпеки ніжних компонентів тканин сенсорних органів, нами рекомендована парафіново-целлоидинова заливка з наступним укладанням об'єкта в парафін-ланолін. Це необхідно, з одного боку зважаючи на те, що щільність гістологічних структур одного і того ж органу різна (наприклад, склера: кришталик-сітківка: підвіска) і т.п. Вдале поєднання парафін-целлоїдину та парафін-ланоліну дозволяє не лише достатньою мірою ущільнити м'які тканини, але й також добре зв'язати їх ніжні та крихкі елементи. Такий підхід не тільки максимально запобігає порушенням цілісності тканин при їх різанні, але й дозволяє виконати досить тонкі зрізи. Таким чином, око найкраще різати в напрямку «ззаду до переду»: при цьому виключається компресія, що ушкоджує сітківку. Аналогічно потрібно різати попередньо ізольовану сітківку.

Забарвлення зрізів, зазвичай, залежить від мети дослідження: підбір окремого барвника чи його поєднання, у зв'язку з особливостями тканинної адсорбції, проводиться індивідуально. Так, при фарбуванні нервової тканини не обов'язково користуватися класичною методикою сріблення клітинних

кордонів за Рамон-і-Кахалєм: досить хороші результати фарбування можна отримати, застосовуючи модифіковані нами спиртовий розчин карміну Майєра та мікробіологічну суміш Цинзерлінгу. Забарвлення зрізів ділянок нервової тканини та сенсорних органів можна також зробити гематоксином Бемера в комбінації з фукселіном Харта (еозином).

Укладення забарвлених і просвітлених зрізів зазвичай проводиться у канадському бальзамі.

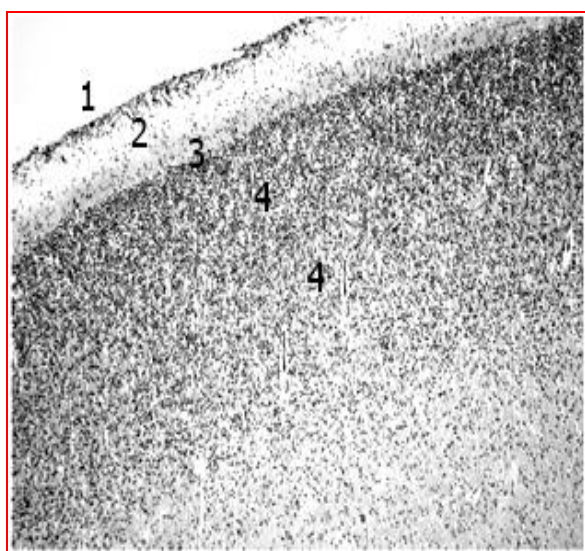


Рис. 2.1.1 – Кора головного мозку:
21-й тиждень гестації.
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта
(у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
80х.
Препарат М.С. Козія.

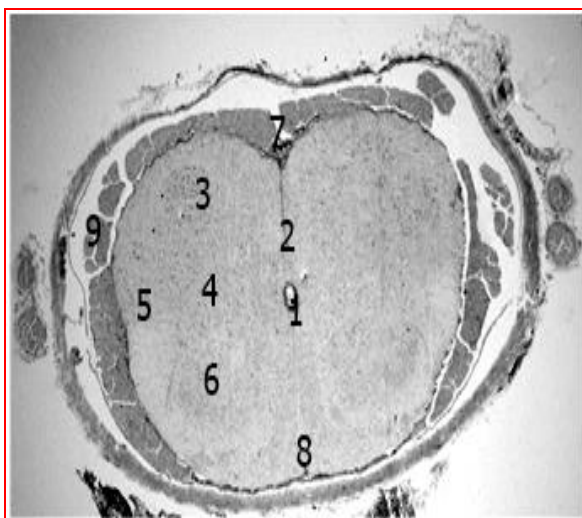


Рис. 2.1.2 – Спинний мозок:
22-й тиждень гестації.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
20х.
Препарат М.С. Козія.

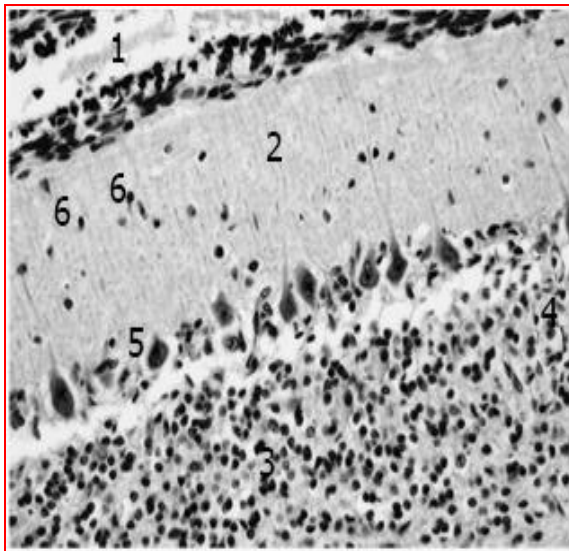


Рис. 2.1.3 – Кора мозочка:
25-й тиждень гестації.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^x. 300х.
Препарат М.С. Козія.

2.2 Особливості гістологічної техніки крові та органів кровоносної системи

Мазки крові виконуються за особливими правилами: їх не можна пересушувати, тому що при цьому відбувається руйнування деяких формених елементів (тромбоцитів та деяких груп лейкоцитів); не рекомендовано також прискорене сушіння за допомогою потоку теплого повітря – воно є причиною спотворення гематологічної картини на мікропрепараті.

Як було зазначено в п. 1.1, мазок відразу після висушування необхідно зафіксувати однією-двома порціями метилового спирту протягом однієї хвилини (інші спирти для цієї мети непридатні). Видаливши залишки фіксатора фільтрувальним папером і ретельно просушивши мазок, його фарбують (забарвлення можна зробити трохи пізніше, оскільки фіксат на повітрі довго не руйнується).

Забарвлення найчастіше роблять гематоксиліном-еозином, або азур-еозином за Романовським. Забарвлений, позбавлений надлишку барвників і просушений мікропрепарат може бути укладений у відповідне середовище. Наш досвід показує, що перед укладанням в канадський бальзам, препарат не обов'язково попередньо просвітлювати в О-ксилолі: цілком достатньо нанести

краплю середовища на сухий мазок (при цьому О-ксилол, що є розчинником канадського бальзаму, виконає просвітлення).

Примітно, що виготовлені в такий спосіб мікропрепарати крові не завжди виразно проглядаються, оскільки внаслідок просвітлення клітинні межі еритроцитів та лейкоцитів стають абсолютно прозорими. У зв'язку з цим, ми пропонуємо пофарбований та просушений мазок взагалі не укладати. Надалі такий мікропрепарат необхідно оберігати від випадкових дотиків та попадання пилу: при правильному зберіганні він служить довгі роки, якість його не знижується.

Виготовлення тонких гістологічних зрізів елементів кровоносної системи за допомогою класичних гістологічних методик, зазвичай, важко. Так, тривале перебування міокарда та судинних елементів у спиртах, О-ксилолі та парафіні призводить до їх переущільнення: якість одержуваних зрізів при цьому не гарантована. Уникнути цього можна, якщо попередньо розм'якшуючи міокард рициновим маслом, що входить до складу целлоидиновой суміші, або скорочуючи терміни гістотехнічних операцій при заливанні у парафін-восколит.

Зазначено, що мікропрепарати лімфоїдної тканини дуже важкі у виконанні. Необхідно пам'ятати, що при їх виготовленні застосування заливних середовищ «парафін-віск» або «парафін-восколіт» неефективно: при сушінні попередньо розправлених зрізів відбувається їхнє розтріскування внаслідок стиснення тканини і надалі мікропрепарат нагадуватиме «мозаїку». Крім цього, ці заливні середовища не дозволяють отримувати зрізи, що відповідають за своєю товщиною лінійним розмірам клітин лімфоїдної тканини (напівтонкі зрізи нагадують суцільний гомогенний пласт, оскільки клітини гіперхромно забарвлюються гематоксиліном). Оптимальним підходом отримання тонких (порядку 2-3 мкм) зрізів є використання модифікованого нами способу парафін-целлоидиновой заливки Апаті. Наступне укладання тканин парафін-ланолін дозволяє отримати блоки, різання яких на мікротомі нескладна, розправлені зрізи відрізняються цілісністю.

При фарбуванні зрізів тканин кровоносної та лімфатичної систем доцільно користуватися «м'якими» рецептами гематоксиліну, зокрема, гематоксиліном Гейденгайна (рідше гематоксиліном Ерліха).

Укладають пофарбовані та освітлені мікропрепарати в канадський бальзам.

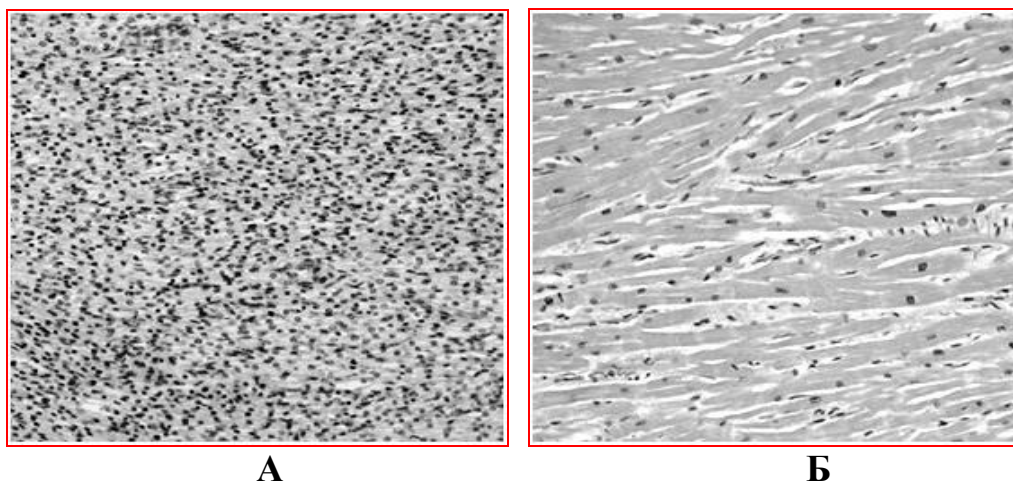


Рис. 2.2.1 – Цитоплазматичне співвідношення міокарда плода (А) та міокарда дорослої людини (Б).

Гематоксилін Бемера фукселін Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. 120х.

Препарати М.С. Козія.

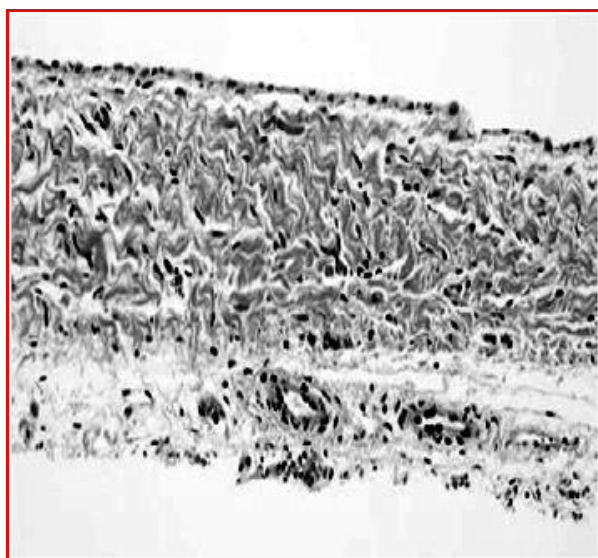


Рис. 2.2.2 – Перикард плода:

23-й тиждень вагітності.

Гематоксилін Бемера фукселін

Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х.

120х.

Препарат М.С. Козія.

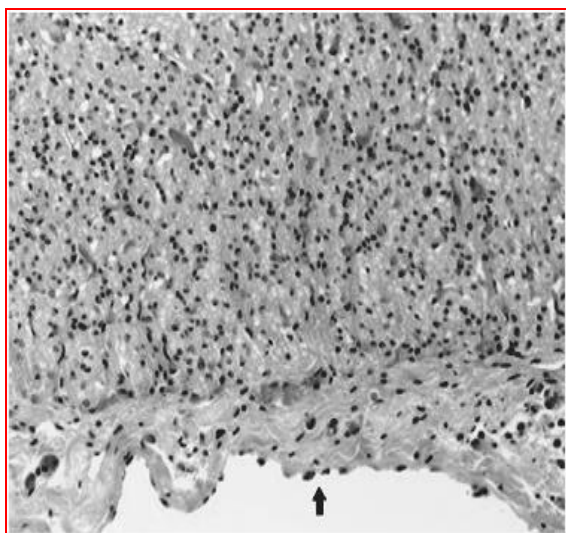
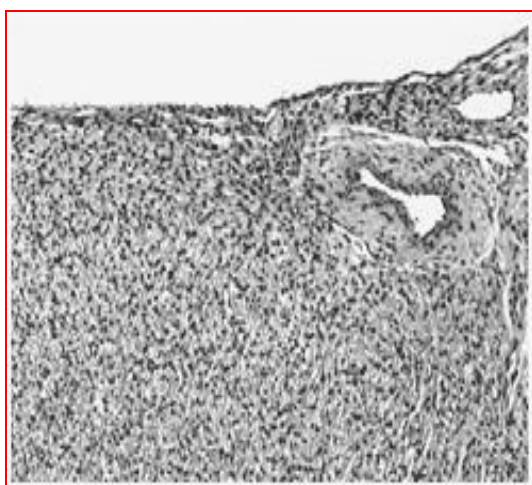
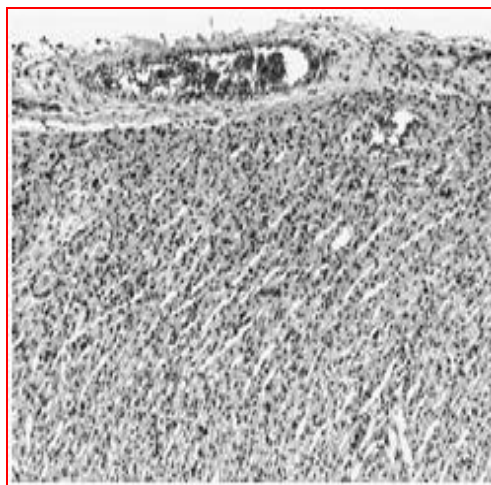


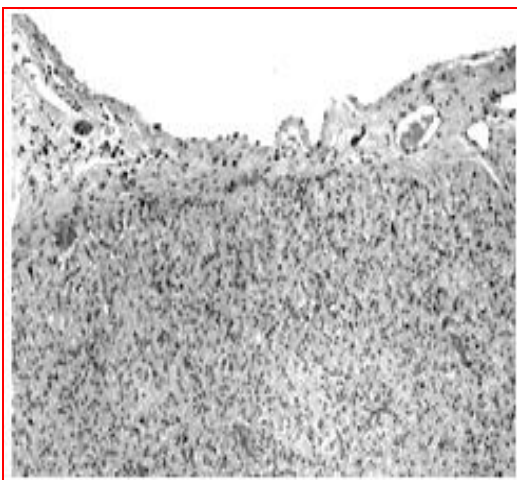
Рис. 2.2.3 – Епікард плода:
34-й тиждень вагітності.
Гематоксилін Бемера фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
120х.
Препарат М.С. Козія.



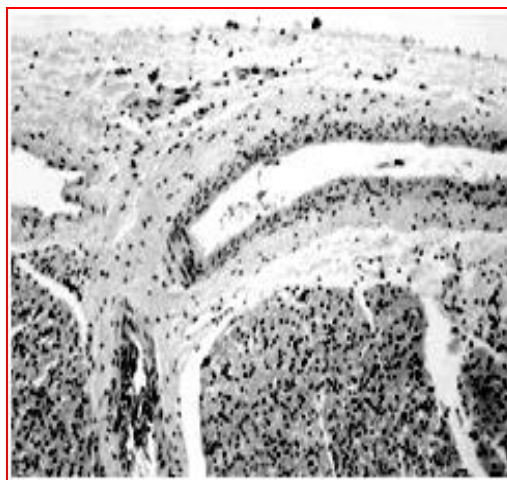
А



Б



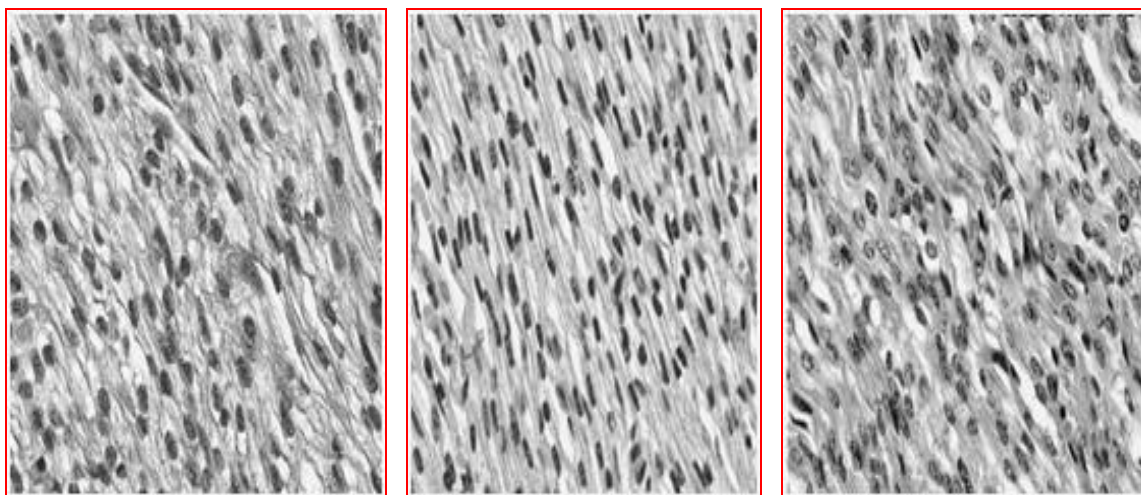
В



Г

Рис. 2.2.4 – Епікард під час вагітності.
Епікард серця у гестаційному віці: А – 14 тижнів; Б – 24 тижні;
В – 34 тижні; Г – 40 тижнів.

Гематоксилін Бемера фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 80х.
Препарати М.С. Козія.



А

Б

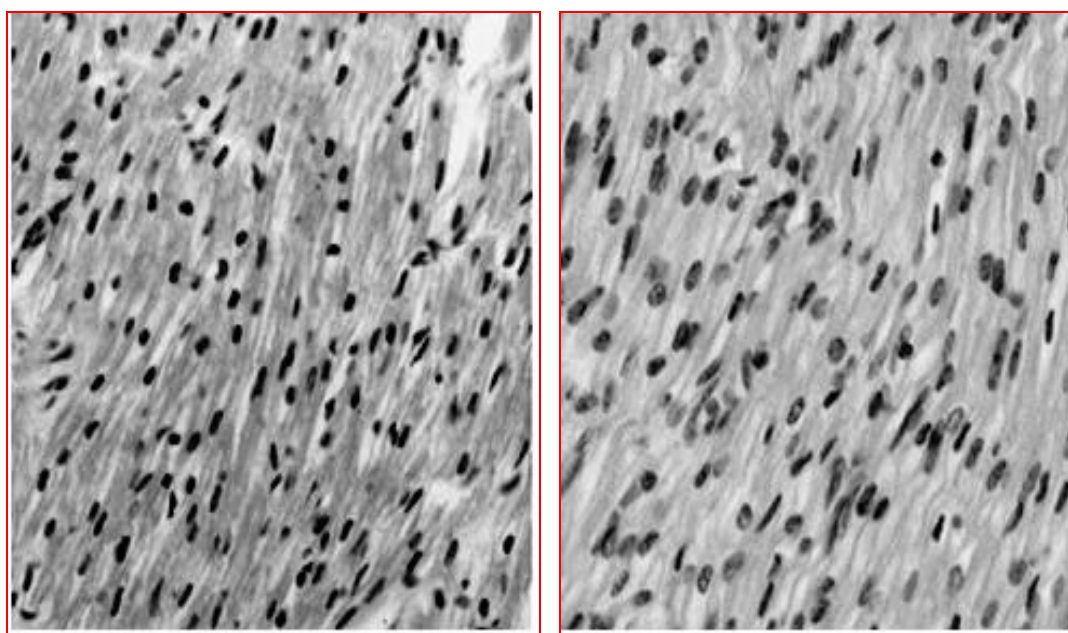
В

Рис. 2.2.5 – Міокард плода у другому триместрі.
Міокард у гестаційному віці: А – 14 тижнів; Б – 19 тижнів; В – 24 тижні.

Гематоксилін Бемера фукселін Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. X120.

Препарати М.С. Козія.



А

Б

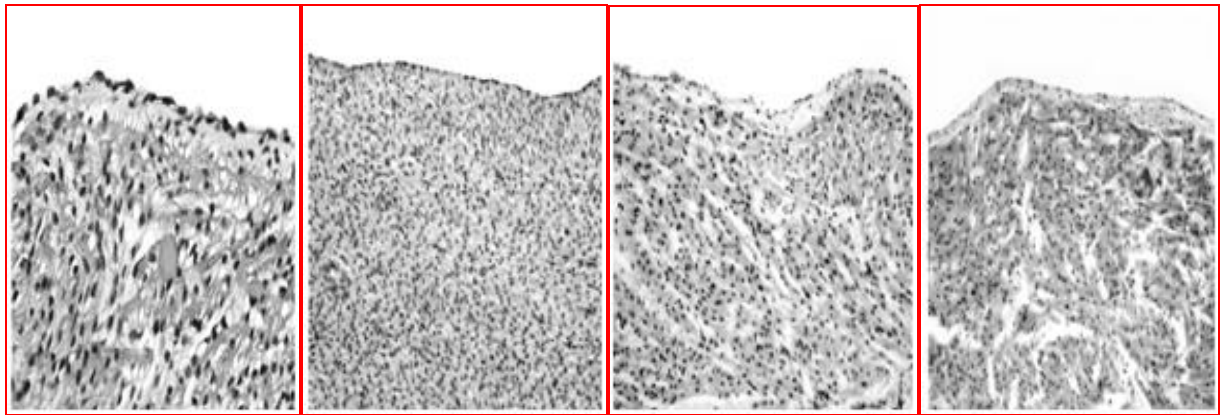
Рис. 2.2.6 – Міокард плода у третьому триместрі.

А – 34 тижні; Б – 40 тижнів.

Гематоксилін Бемера фукселін Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. X100, 120х.

Препарати М.С. Козія.



А

Б

В

Г

Рис. 2.2.7 – Ендокард лівого шлуночка під час вагітності.
А – 14 тижень; Б – 24 тижня; В – 34 тижня; Г – 40 тижень.
Гематоксилін Бемера фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. 80х.
Препарати М.С. Козія.



Рис. 2.2.8 – Праве передсердя
плода на початку
23-го тижня вагітності.
Гематоксилін Бемера фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х.
120х.
Препарат М.С. Козія.



Рис. 2.2.9 – Аорта на 23-му тижні
вагітності.
Гематоксилін Бемера фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х.
10х.
Препарат М.С. Козія.

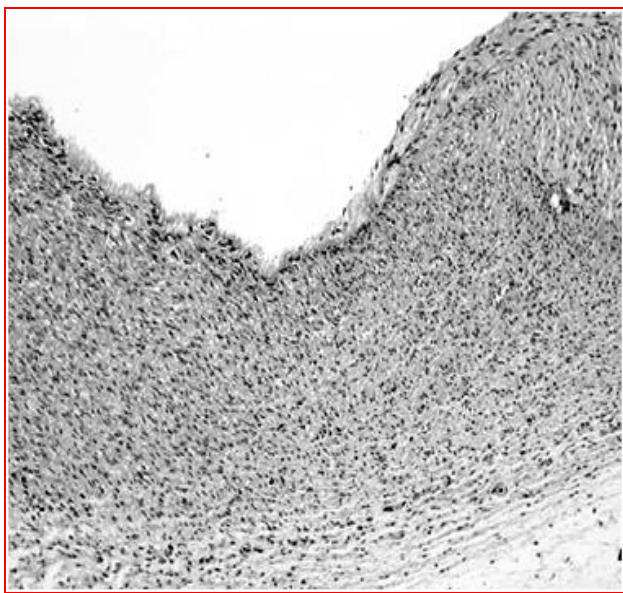


Рис. 2.2.10 – Артеріальна протока в середині триместру (21 тиждень вагітності). Гематоксилін Бьомера, фукселін Харта (у модифікації). Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 10х. Препарат М.С. Козія.

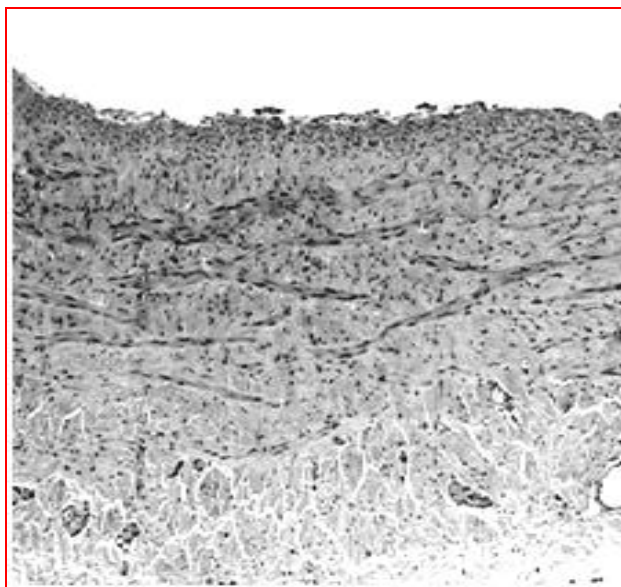


Рис. 2.2.11 – Пупкова вена наприкінці терміну вагітності. Гематоксилін Бьомера, фукселін Харта (у модифікації). Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 10х. Препарат М.С. Козія.

2.3 Особливості гістологічної техніки дихальної системи

Гістологічні зрізи дихальної системи отримати неушкодженими вдається лише у виняткових випадках. Це пов'язано, в першу чергу, з тим, що різні елементи мають неоднакову щільність: від малої (легеневі мішки) до дуже щільної (хрящова основа повітроносних шляхів).

Для отримання хороших зрізів, попередньо зафіксовані в рідині Буена зразки необхідно провести через парафін-целоїдин і остаточно залити парафін-ланолін.

Позитивною якістю парафін-ланолінового заливного середовища є можливість отримання з її допомогою тонких зрізів (2-3 мкм), що особливо необхідно для виявлення тонкої структури васкулярної системи.

Запорукою якісного різання є попередня фрагментація органокомплексу: з одного великого блоку викроюються блоки менших розмірів: різання на мікротомі тканин, що мають однакову щільність, значно полегшується.

Орієнтація кожного фрагмента відносно мікротомного ножа має бути поздовжньою: при поперечній орієнтації можливе «протягування» хрящової тканини в товщі парафіну з подальшою фрагментацією м'яких елементів і навіть розривом зрізу.

При фарбуванні зрізів рекомендовано використовувати гематоксилін Гейденгайна; випадкове перефарбовування еозином не потребує диференціювання, оскільки корисно посилює контраст мікропрепарату. Іноді для посилення візуального ефекту замість еозину можна використовувати інші барвники, наприклад, крезоловий зелений.

Укладають забарвлені та просвітлені зрізи зазвичай у канадський бальзам.

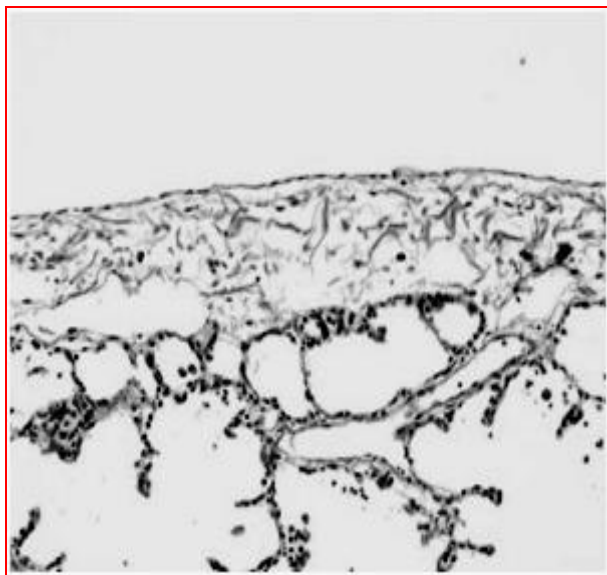


Рис. 2.3.1 – Нормальна післяродова легень. 5 місяців (1).

Вісцеральна плевральна фігура.

Гематоксилін Бемера, фукселін

Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.

40x.

Препарат М.С. Козія.

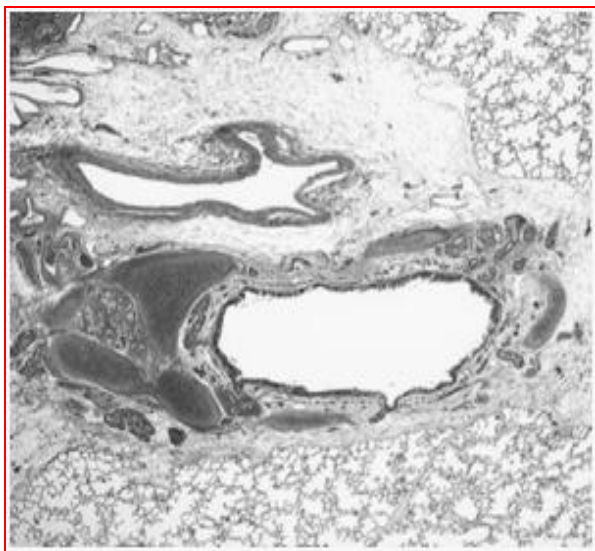


Рис. 2.3.2 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (2).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
20х.
Препарат М.С. Козія.

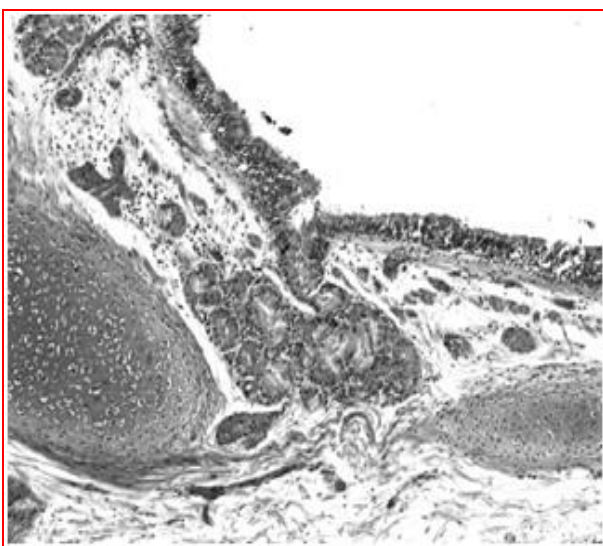


Рис. 2.3.3 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (3).
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта
(у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 70х.
Препарат М.С. Козія.

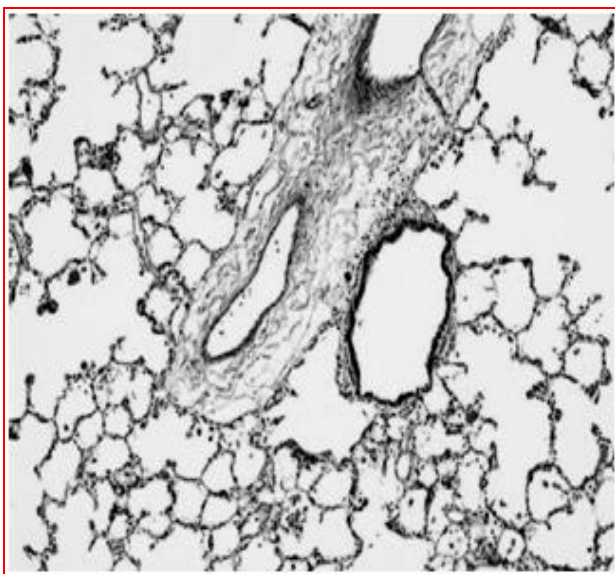


Рис. 2.3.4 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (4).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
20х.
Препарат М.С. Козія.

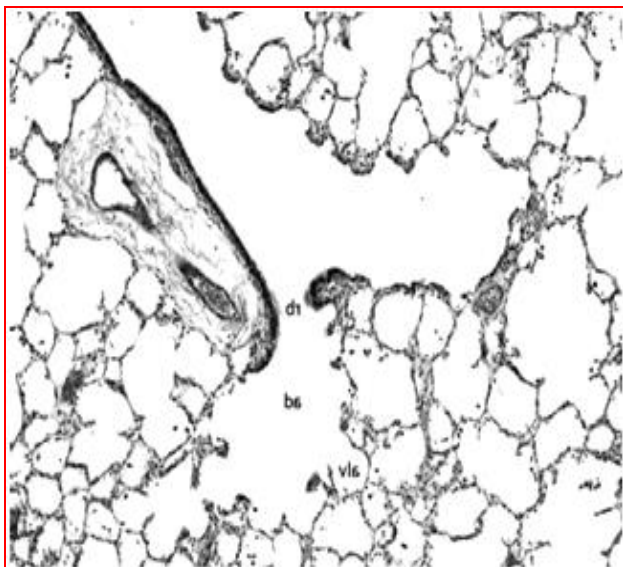


Рис. 2.3.5 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (5).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
20х.
Препарат М.С. Козія.

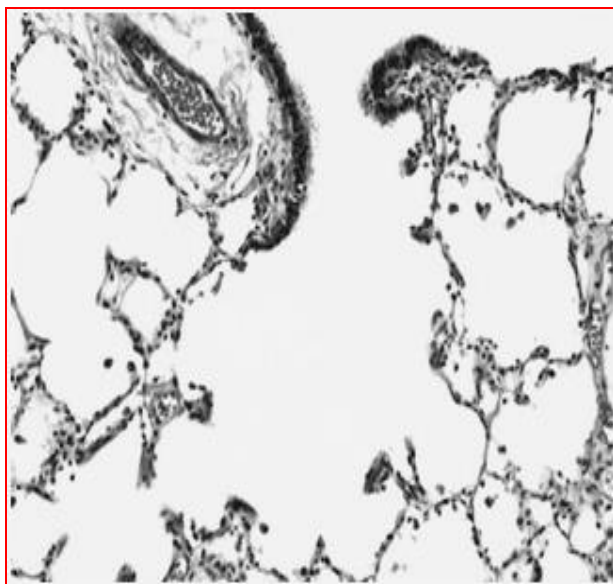


Рис. 2.3.6 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (6).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
100х.
Препарат М.С. Козія.

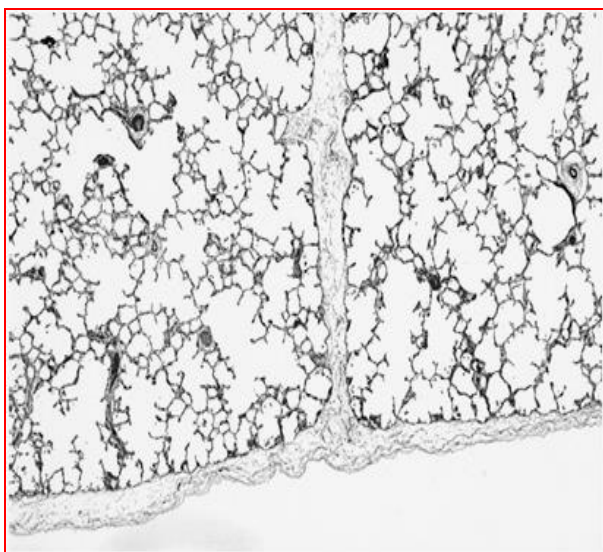


Рис. 2.3.7 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (7).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
15х.
Препарат М.С. Козія.

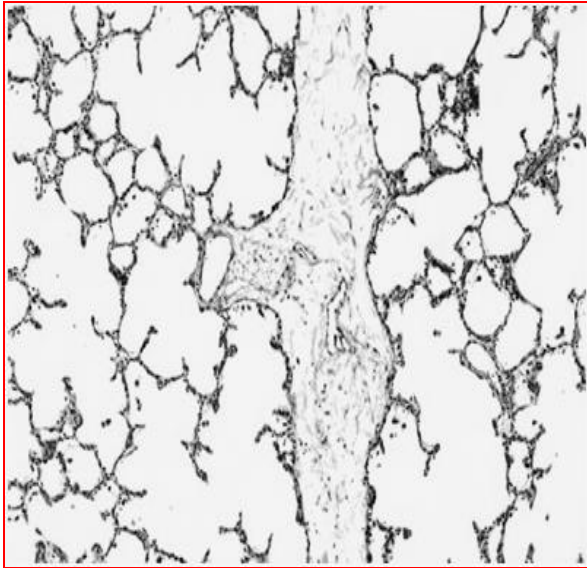


Рис. 2.3.8 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (8).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
20х.
Препарат М.С. Козія.

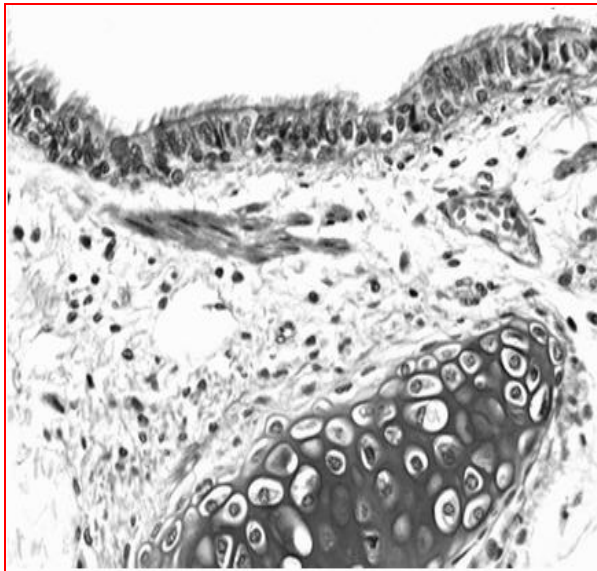


Рис. 2.3.9 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (9).
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта
(у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
250х.
Препарат М.С. Козія.

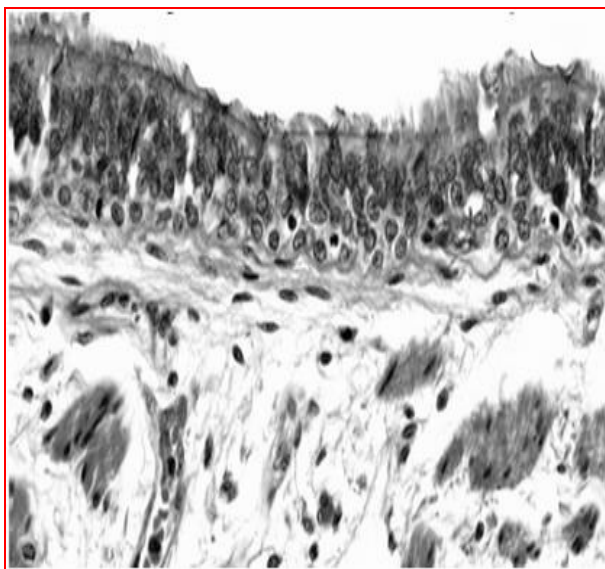


Рис. 2.3.10 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (10).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
350х.
Препарат М.С. Козія.

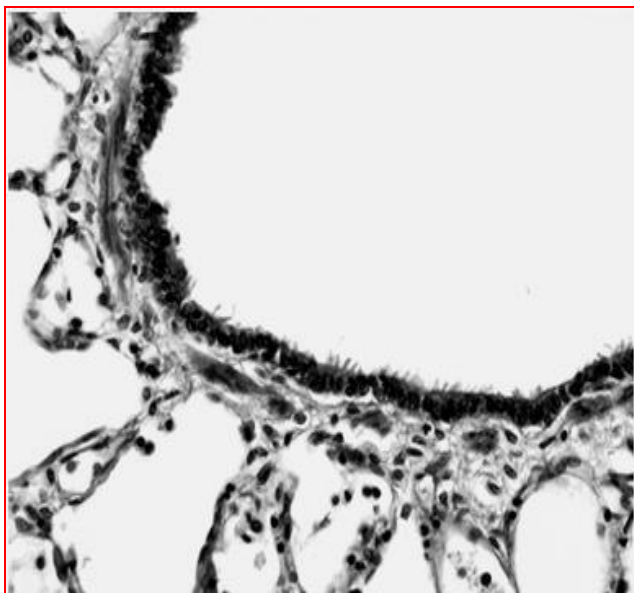


Рис. 2.3.11 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (11).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
250х.
Препарат М.С. Козія.

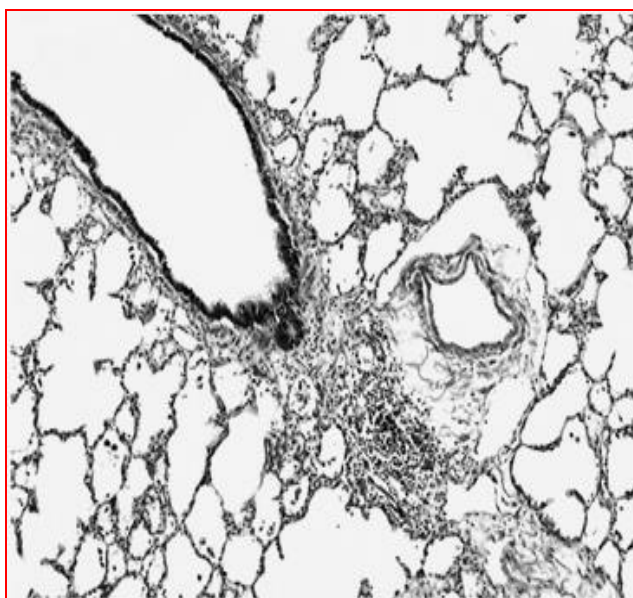


Рис. 2.3.12 – Нормальна
післяродова легеня. 5 місяців (12).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
20х.
Препарат М.С. Козія.

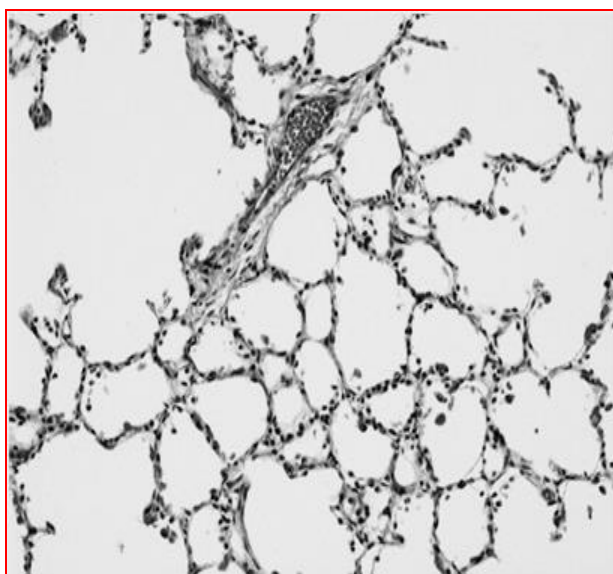


Рис. 2.3.13 – Нормальна
післяродова легеня.
5 місяців (13).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-
2,5^x. 80х.
Препарат М.С. Козія.

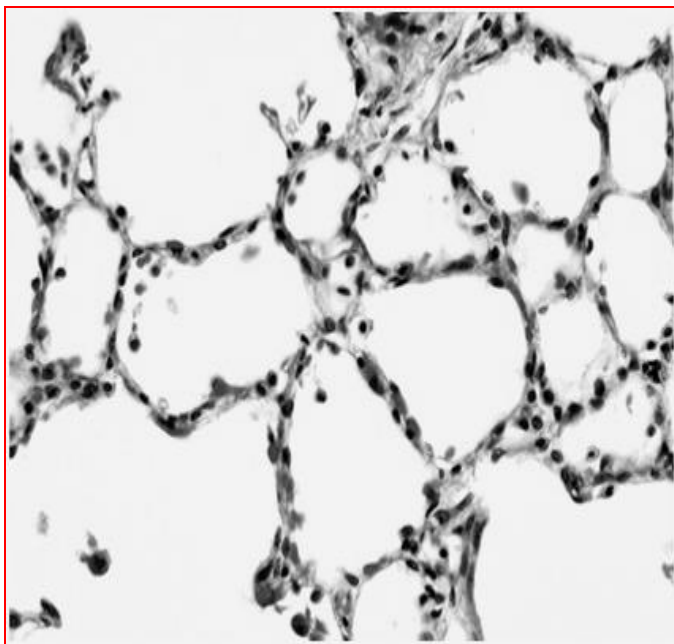


Рис. 2.3.14 – Нормальна
післяродова легеня.
5 місяців (14).
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-
2,5^x. 150^x.
Препарат М.С. Козія.

2.4 Особливості гістологічної техніки травної системи

Гістологічна техніка різних ділянок травного тракту відрізняється великою різноманітністю прийомів та методів і залежить від низки факторів. Заливка зубів та їх укладання в ущільнювальне середовище, як правило, неефективна без попередньо проведеної декальцинації.

Гістологічна обробка глотки, незважаючи на її структурну поліморфність, не становить труднощів. Найкращою методикою заливки об'єкта є парафін-целлоїдин Апаті в нашій модифікації, з остаточною заливкою парафін-ланолін. Вибір цієї методики викликаний необхідністю виконання зрізів різної товщини, тому що на них необхідно показати як великі слизові оболонки з секретом, так і дрібні елементи рухового апарату.

Таким же чином потрібно обробляти ділянки кишкової трубки: целоїдин, що проникає в слизову оболонку, підслизову кишечника, її власну пластинку, лімфоїдну тканину, додатково ущільнює і пов'язує їх з щільними еластичними мембранами циркулярного м'язового шару при мікротомії шлунку.

Примітно, що поряд з хорошою схоронністю тканинних елементів, важливим показником якості парафін-целлоїдинового методу є збереження в

епітелії кишкових складок неушкодженої облямівки, що не властиве результатам проведення на основі ацетонового зневоднення.

Парафін-целоїдінова проводка з наступним заливанням в парафін-ланолін з успіхом застосовується для заливання печінки та підшлункової залози. Це особливо важливо, оскільки, незважаючи на невисоку щільність паренхіми та порівняно великі розміри їх клітин, застосування інших методик заливання небажано через їх виражене стиснення.

Ефективні результати фарбування зрізів ділянок травного тракту досягаються при використанні «жорстко» барвника гематоксиліну Бемера, так як великі ядра епітелію слизових оболонок та клітинні межі недостатньо добре адсорбують інші барвники. У зв'язку з цим, гематоксиліни Ерліха та Гейденгайна застосовуються набагато рідше.

Фарбування еозином зрізів травного тракту вимагає великої обережності, оскільки всі без винятку елементи тканин гіперацидофільні (гіперхроматичні). З урахуванням цього факту, краще користуватися сильно розведеними розчинами спиртового еозину (фукселіну Харта), або забарвлювати зрізи його водними розчинами.

Укладають просвітлені мікропрепарати зазвичай у канадський бальзам.

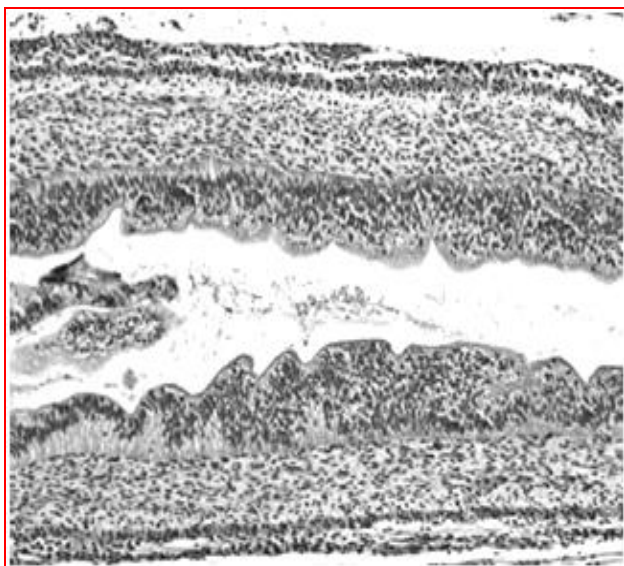


Рис. 2.4.1 – Стравохід:
11 тижнів вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х.
200х.
Препарат М.С. Козія.

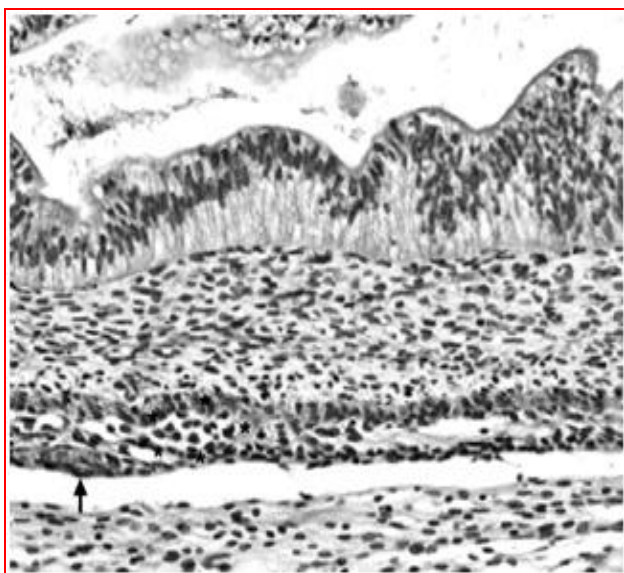


Рис. 2.4.2 – Стравохід:
11 тижнів вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації). Корируючий
фільтр ФГПМ-2,5^х. 400х.
Препарат М.С. Козія.

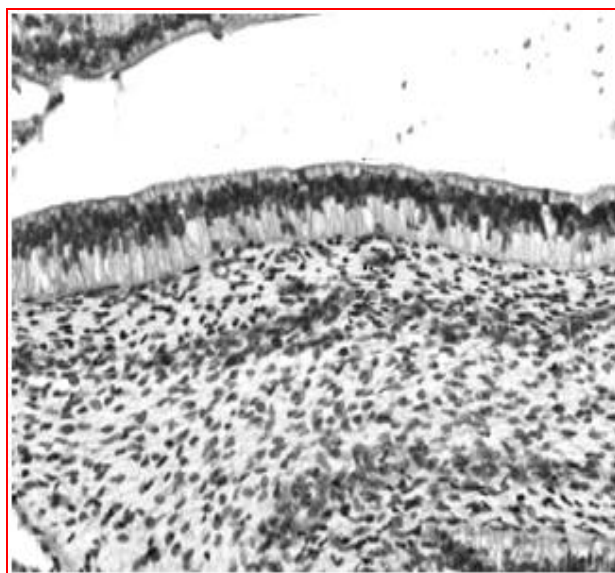


Рис. 2.4.3 – Стравохід:
11 тижнів вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Корируючий фільтр ФГПМ-2,5^х.
300х.
Препарат М.С. Козія.

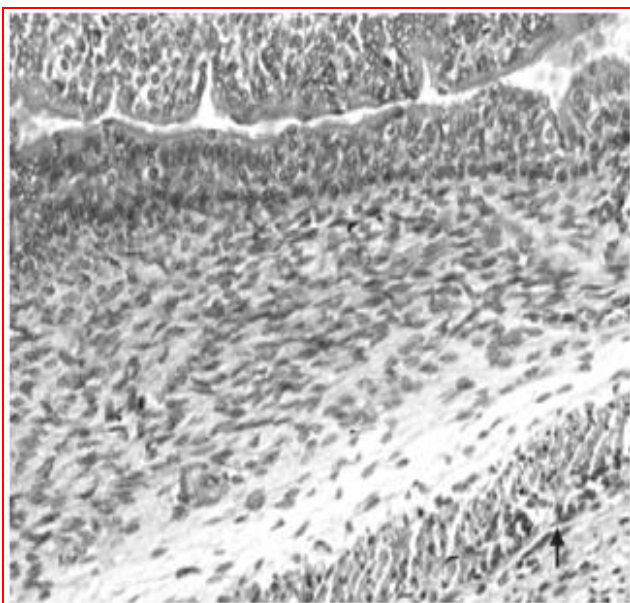


Рис. 2.4.4 – Стравохід:
12 тижнів вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Корируючий фільтр ФГПМ-2,5^х.
250х.
Препарат М.С. Козія.

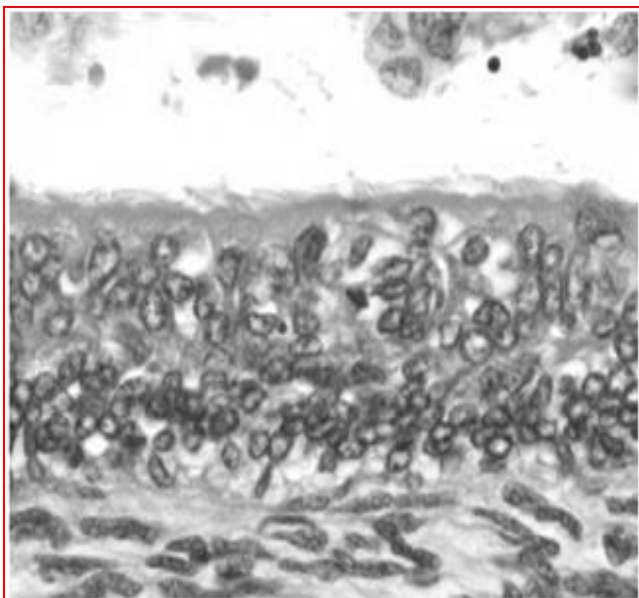


Рис. 2.4.5 – Стравохід:
12 тижнів вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
Олійна іммерсія, 1200х.
Препарат М.С. Козія.

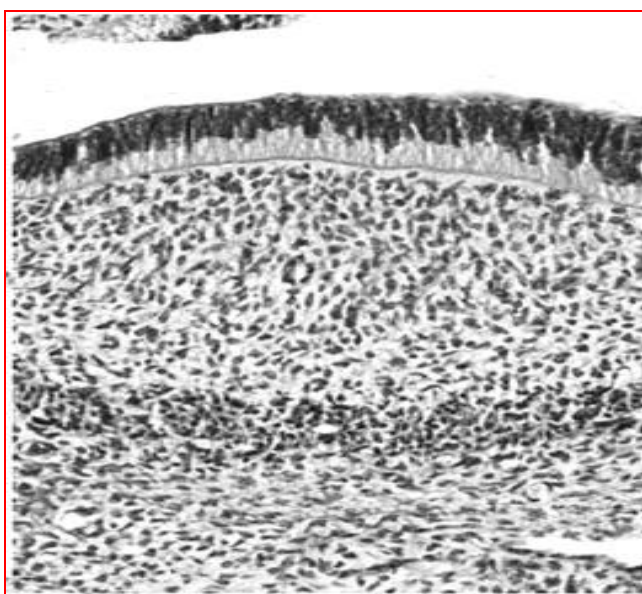


Рис. 2.4.6 – Шлунок через
7 тижнів після запліднення.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
250х.
Препарат М.С. Козія.

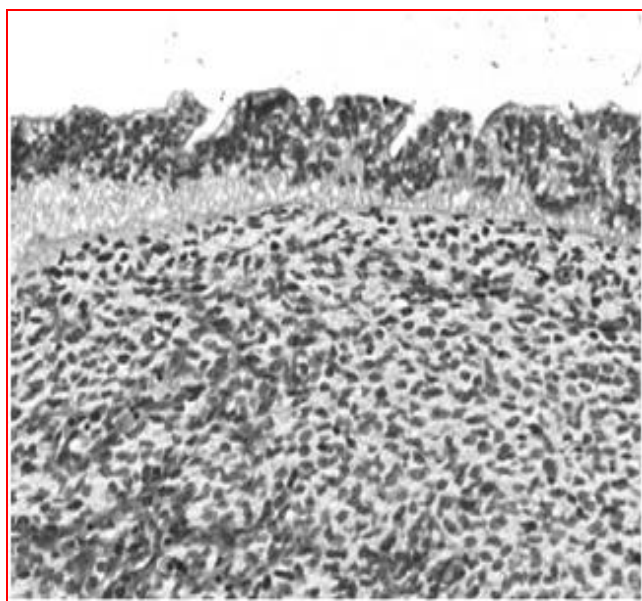


Рис. 2.4.7 – Утворення ямок у
шлунку через 8 тижнів після
запліднення.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
400х.
Препарат М.С. Козія.

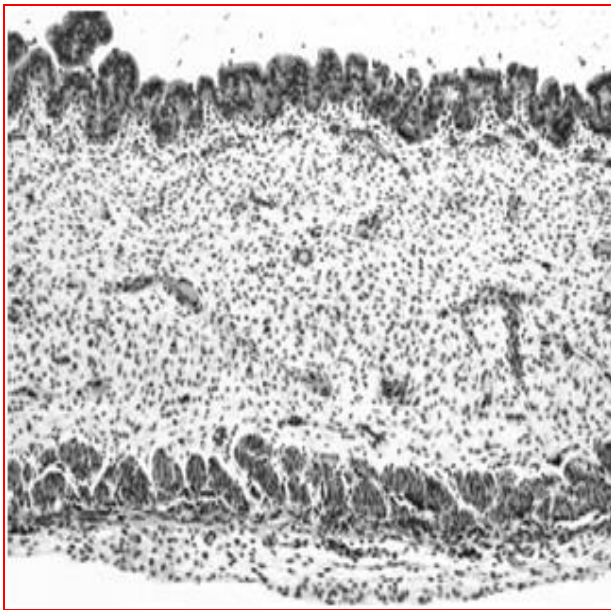


Рис. 2.4.8 – Формування шлункових залоз у шлунку через 12 тижнів після запліднення. Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації). Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 200х.
Препарат М.С. Козія.

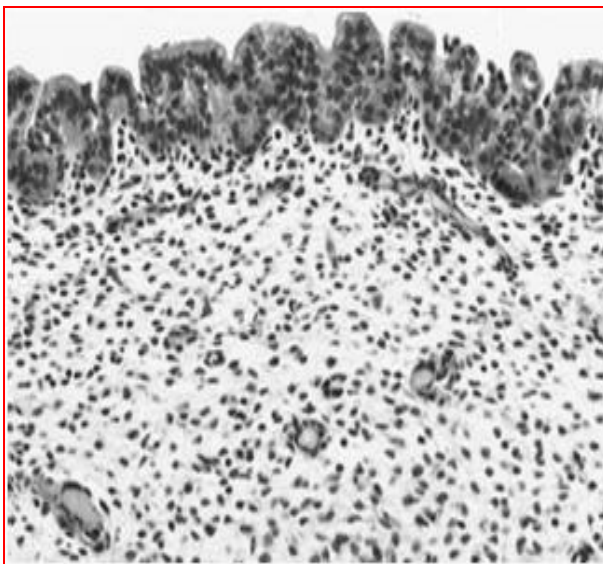


Рис. 2.4.9 – Шлунок через 12 тижнів після запліднення. Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації). Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 250х.
Препарат М.С. Козія.

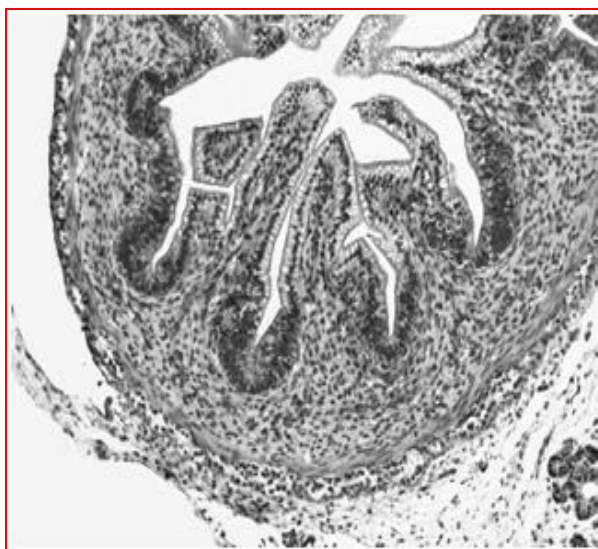


Рис. 2.4.10 – Дванадцятипала кишка через 11 тижнів після запліднення. Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації). Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 100х.
Препарат М.С. Козія.



Рис. 2.4.11 – Дванадцятипала
кишка через 12 тижнів після
запліднення.

Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
250х.

Препарат М.С. Козія

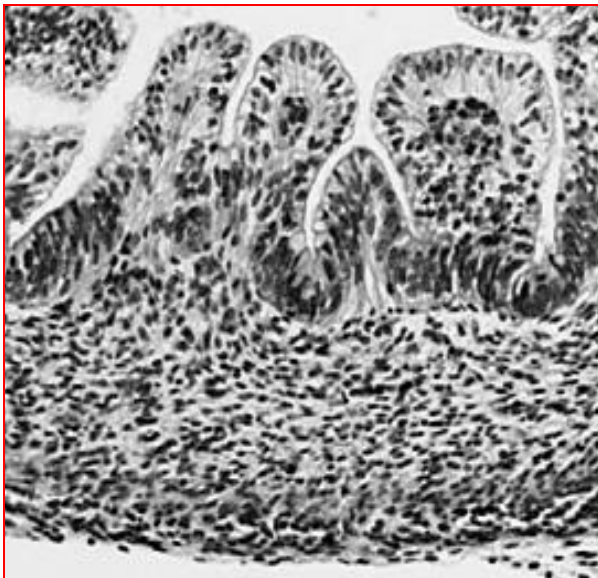


Рис. 2.4.12 – Товста кишка
через 12 тижнів після запліднення.

Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-
2,5^x. 250х.

Препарат М.С. Козія.

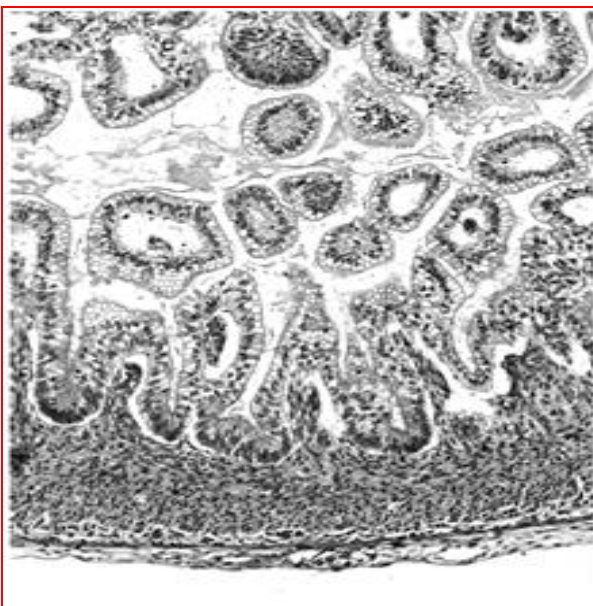


Рис. 2.4.13 – Товста кишка через
15 тижнів після запліднення.

Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
100х.

Препарат М.С. Козія.



Рис. 2.4.14 – Апендикс на
19-му тижні.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий ФГПМ-2,5^x. 40х.
Препарат М.С. Козія.



Рис. 2.4.15 – Анальний канал на
21-му тижні.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
60х.
Препарат М.С. Козія.

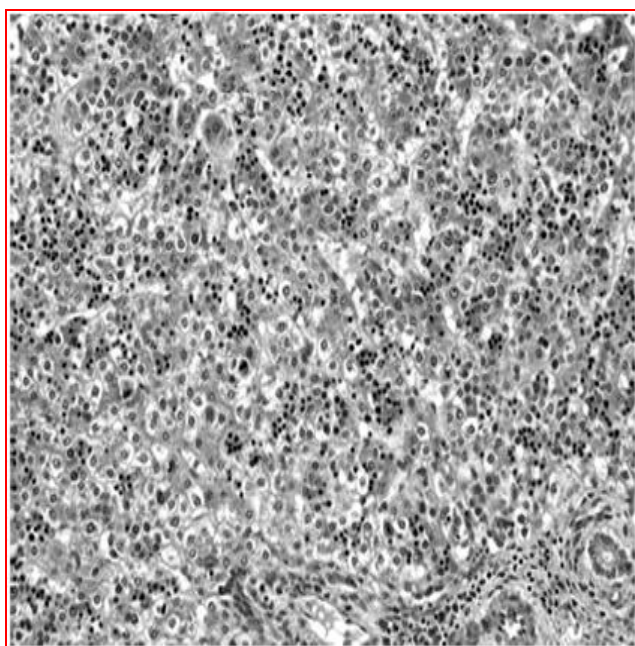
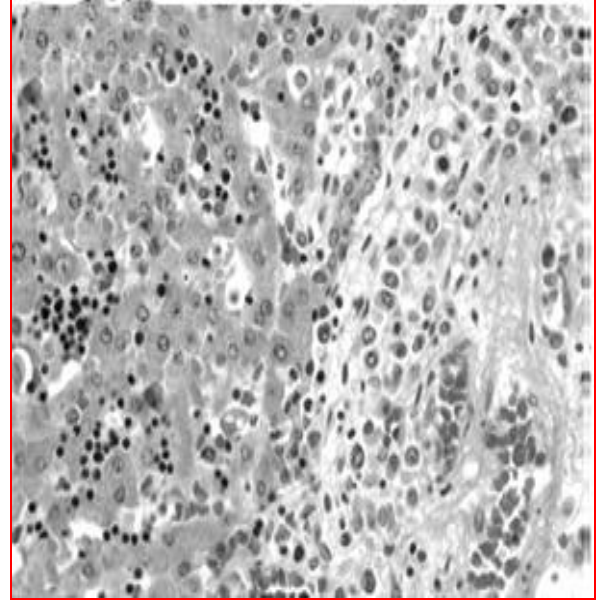


Рис. 2.4.16 – Печінка
20-тижневого плоду.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
200х.
Препарат М.С. Козія.



А



Б

Рис. 2.4.17 – Кровотворення у печінці плода.

А – кровоторення у печінці 18-тижневого плода; Б – еритропоез у синусоїдах та мієлопоез у портальному тракті.

Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. X100, X200.

Препарати М.С. Козія.

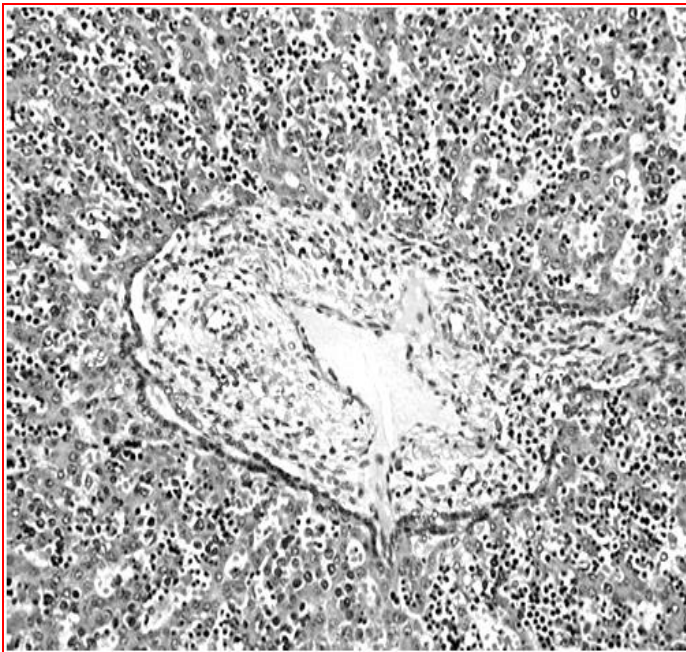
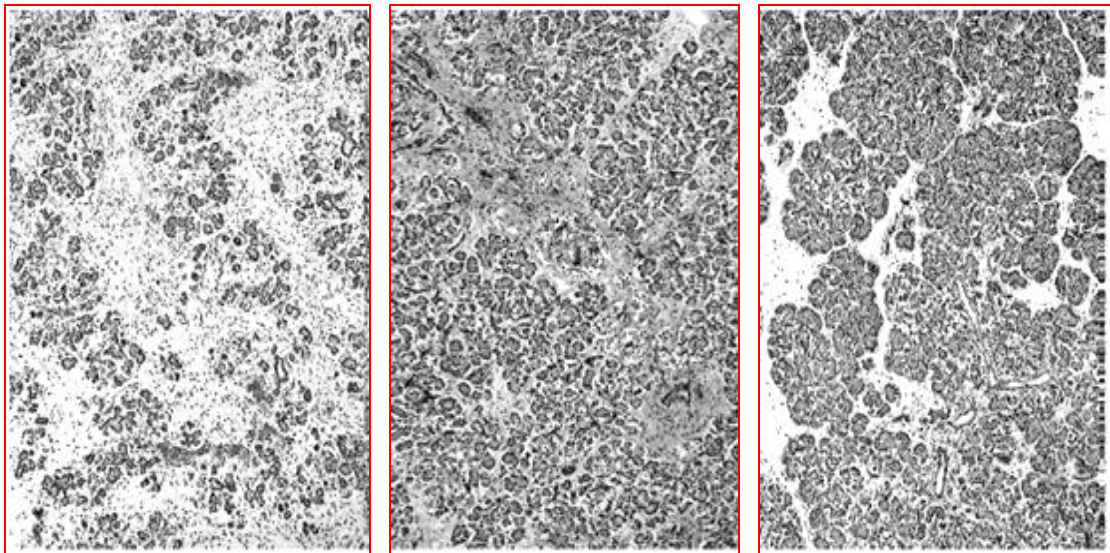


Рис. 2.4.18 – Розвиток жовчовивідних шляхів у 17-тижневого плода.

Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. 200х.

Препарат М.С. Козія.



А

Б

В

Рис. . 2.4.19 – Строма підшлункової залози.

А – 16 тижнів; Б – 32 тижні; В – 38 тижнів.

Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. 50х.

Препарати М.С. Козія.

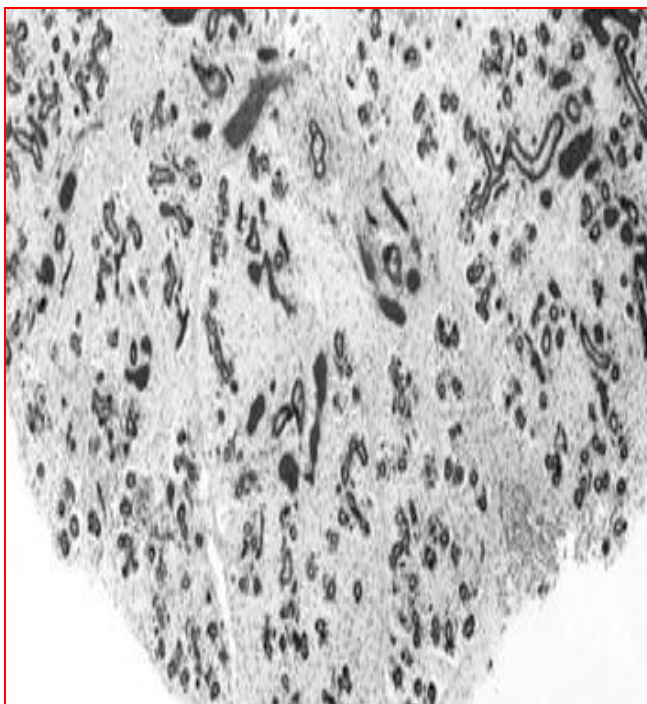


Рис. 2.4.20 – Піднижньощелепна залоза на 16-му тижні.

Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. 40х.

Препарат М.С. Козія.



Рис. 2.4.21 – Піднижньощелепна залоза на 16-му тижні.
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
100х.
Препарат М.С. Козія.

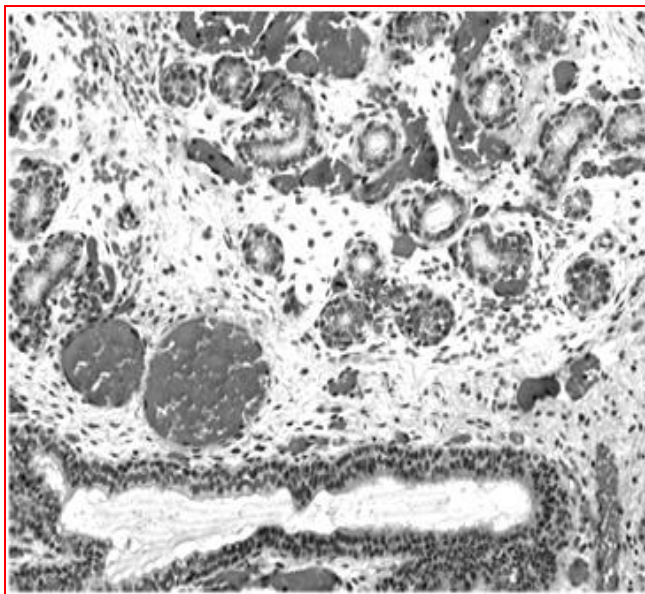


Рис. 2.4.22 – Піднижньощелепна залоза на 19-му тижні.
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
200х.
Препарат М.С. Козія.

3.5. Особливості гістологічної техніки кістково-м'язової системи

Для отримання напівтонких (7-10 мкм) зрізів кісткової та хрящової тканин їх заливають у дуже густі (10-15%) ефірно-спиртові розчини тринітроцелюлози. Якщо заливальне середовище недостатньо просочує і утримує об'єкт, що розрізається, його штучно розм'якшують, або декальцинують (див. п. 1.12). У ході декальцинації повністю зберігається структура кісткових балок пластинчастої кістки та прилеглих до них ділянок склоподібного хряща, проте при цьому м'якіші періост, волокнистий та еластичний хрящ, руйнуються.

Метод декальцинації непридатний для отримання зрізів ретикулофіброзної кісткової тканини.

Дуже рідко, як «пом'якшувальний» засіб для кістки та хряща застосовують діафанол (цю речовину використовують у гістології для часткового розм'якшення висохлих формалінових фіксатів і помірно ороговілих об'єктів).

Зазначено, що вибір методики заливання та остаточного укладання дуже щільних тканин неоднозначний: в остаточному визначенні найчастіше потрібен емпіричний підхід. Доведено, що використання декальцинуючих рідин та діафанолу, а також класичних методик проведення та заливання хрящової та кісткової тканини неефективне: зрізи кістки та хряща, зроблені на салазковому мікротомі, складаються з 7-8 шарів клітин. Цене є неприпустимим, так як товщина добре зрізу щільної сполучної тканини коливається в межах 2-3 шарів клітин.

Тонкі зрізи можна отримати, якщо процес осифікації не завершений. Якщо така можливість відсутня, необхідно застосувати кутовий метод різання блоків, що здійснюється за допомогою аркового мікротома: показано сильний притиск блоку до поверхні направляючої пластини приладу та швидкісне різання під гострим кутом відносно вістря ножа.

Гістологічна обробка м'язової тканини загалом нагадує обробку лімфоїдної тканини. Ця група тканин має різне походження, структуру та щільність. Спільним у них є властивість фрагментуватися в розправлених та просушених парафін-восколітових зрізах. Якщо фрагментація лімфоїдної тканини обумовлена стиском заливного середовища, то небажаний «мозаїцизм» м'язових волокон відбувається завдяки надмірному видаленню води з них. Якщо врахувати, що кількість скорочувальних білків у волокнах ембріональної мускулатури досить мала, у зрізі гіпотетично очікується зморщування волокна. Насправді, цього немає, оскільки сарколема м'язового волокна досить міцна: при збереженому контурі волокна м'язові білки групуються в окремі безформні фракції.

Примітно, що явище «мозаїцизму» властиве значно меншою мірою волокнам червоної мускулатури: у всіх випадках гістологічної обробки м'язової тканини, небажана фрагментація легко усувається за допомогою парафін-целоїдинової проводки з наступним заливанням в парафін-ланолін.

При фарбуванні кісткової тканини можна скористатися класичним методом Шморля (забарвленням тіонін-пікриновою кислотою); хрящову тканину можна дуже яскраво пофарбувати за модифікованим методом Цинзерлінга.

Для фарбування м'язової тканини зазвичай використовують гематоксилін Бемера разом із еозином. Вибір насиченого ядерного барвника обумовлений низькою адсорбційною здатністю ядер симпласту та клітинних кордонів; саркоплазма, навпаки, має яскраво виражену гіперхроматичність (ацидофільність). Ця властивість успішно використовується для досягнення візуально вираженого ефекту – він досягається забарвленням саркоплазми м'язових волокон фукселіном Харта.

Укладають забарвлені та просвітлені зрізи в канадський бальзам.

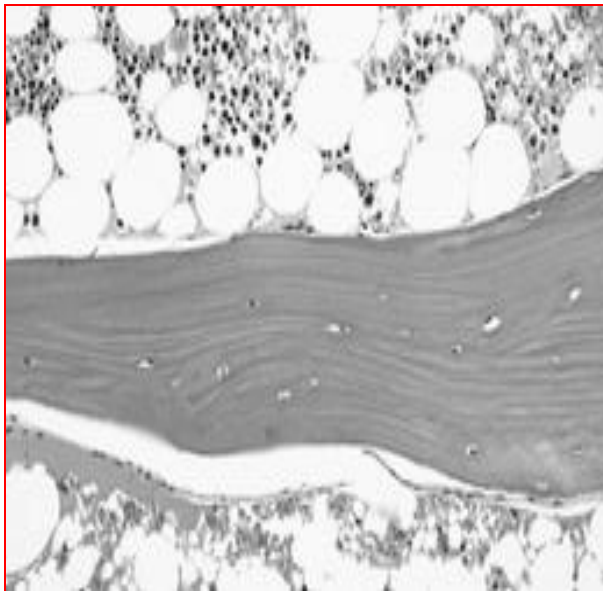


Рис. 2.5.1 – Пластинчаста кістка ембріона.
Гематоксилін Бемера,
фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
200х.
Препарат М.С. Козія.

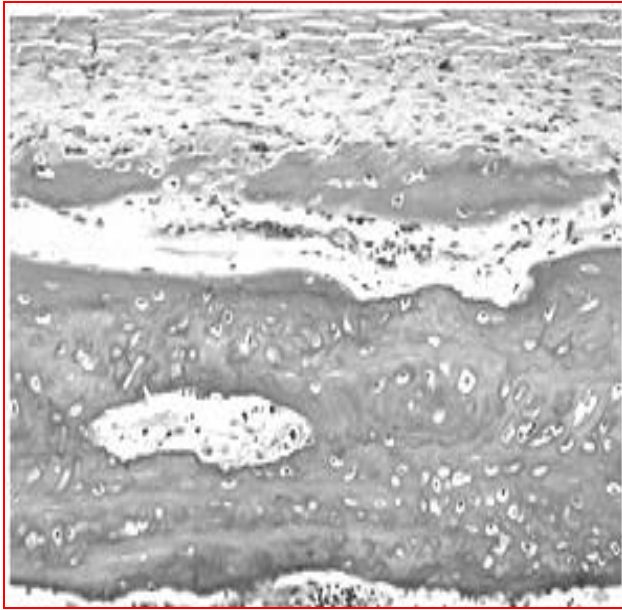


Рис. 2.5.2 – Ретикулофіброзна кістка ембріона.
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 200х.
Препарат М.С. Козія.

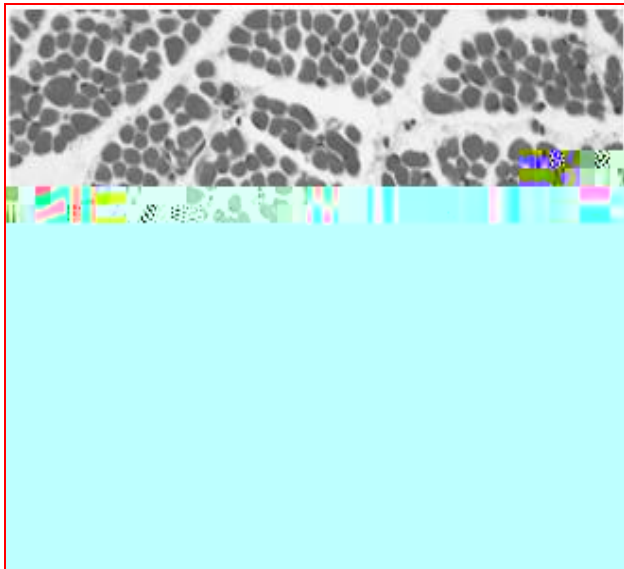


Рис. 2.5.3 – Скелетний м'яз наприкінці терміну вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x. 200х.
Препарат М.С. Козія.

3.6. Особливості гістологічної техніки сечостатевого тракту

Тканини, що входять до складу сечостатевої системи, вирізняються ніжною текстурою. Наші спостереження показують, що у разі застосування проводки на основі ацетонового зневоднення, ниркова паренхіма стає дуже тендітною та крихітною, тобто, практично непридатна до мікротомного різання. Можна припустити, що внаслідок дії безводного ацетону на похідні аміаку відбувається їх дегідратація з подальшим утворенням мікрокристалів у цитоплазмі клітин та міжклітинному просторі. На наш погляд, ці конкреції є

основною причиною погіршення різання тканинних блоків. Парафін-целоїдинова проводка є методикою, що дозволяє максимально зберегти структури ниркової тканини; з іншого боку, вибір даної методики проведення обґрунтований малими розмірами клітин епітелію ниркових каналців, судинних клубочків. Ниркова тканина та сечовий міхур, згодом залиті в парафін-ланолін, чудово ріжуться на мікротомі: за необхідності можна отримати зрізи завтовшки в одну клітину.

Цей підхід також дуже ефективний при гістологічній обробці статевих залоз: для хорошого перегляду зрізи повинні мати малу товщину близько 2-3 мкм. По-перше, статеві клітини різних стадіях ово- сперматогенезу мають малі розміри; по-друге – у напівтонких, і, особливо, у товстих зрізах, відбувається багаторазове нашарування клітинних мас. Такі зрізи непридатні для дослідження.

Існує широко поширена думка щодо застосування до яєчників класичної парафінової методики як уніфікованої. Очевидно, воно викликане відсутністю необхідності виготовлення тонких зрізів. Практика показує, що виконання якісних зрізів овоцитів пов'язане з низкою труднощів: застосування проводки на основі ацетонового зневоднення з подальшим ув'язненням у парафін-восколить дало негативний результат.

Аналіз результатів проводки показав, що ацетон сильно ущільнює та розпорошує овоплазму, що призводить до сильного зморщування клітин. Уникнути незручностей дозволяє парафін-целоїдинова проводка: у її ході усувається небажане зморщування. Іншою позитивною якістю методики є можливість отримання тонких зрізів, що дозволяють розглянути тонку структуру ядра і гарне збереження ніжних поверхневих оболонок овоциту.

При фарбуванні зрізів тканин сечостатевої системи слід пам'ятати, що вони погано сприймають ядерні барвники: у зв'язку з цим їх доцільно фарбувати гематоксиліном Бемера або дещо слабше фарбуючим кислим гемалауном Майєра. Якщо необхідно виявити тонкі структури хромосомного апарату, можна скористатися гематоксиліном Гейденгайна. Винятком є зрізи сім'яників:

можна обмежитися лише одним забарвленням гематоксиліном, без додаткового підсинення зрізу. Клітини, що знаходяться на різних стадіях сперматогенезу, найвищою мірою сприйнятливі до еозину, або фукселіну Харта (гіперацидофільні) – друге фарбування лише зіпсує зріз. Якщо друге фарбування все ж таки необхідно, рекомендовано використовувати або сильно розведені спиртові, або водні розчини цих барвників.

Укладають забарвлені та просвітлені зрізи в канадський бальзам.

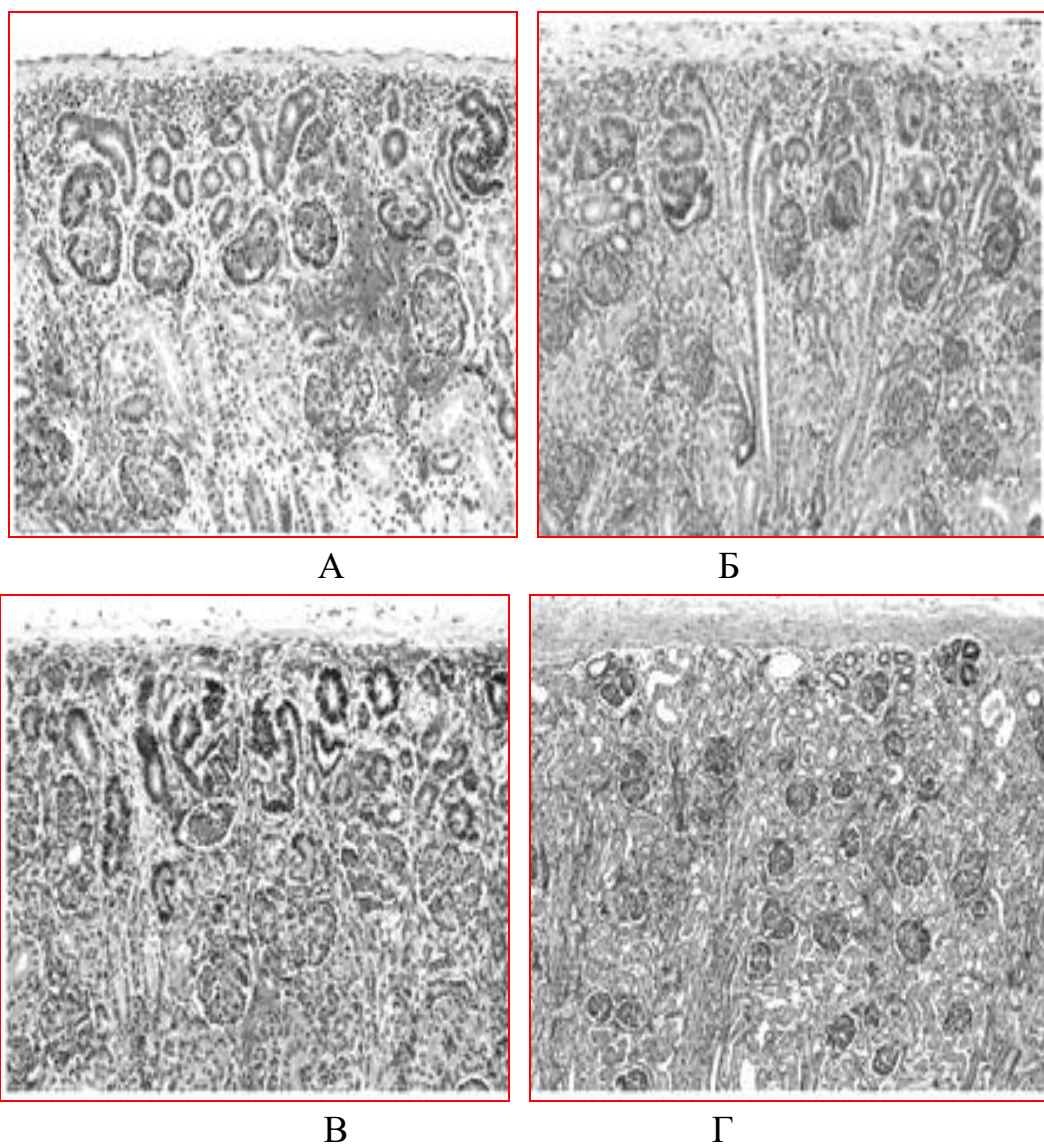


Рис. 2.6.1 – Нейрогенна зона за різних термінів вагітності.
 А – 16 тижнів; Б - 21 тиждень; В – 27 тижнів; Г – 35 тижнів.
 (Гематоксилін Бемера фукселін Харта (у модифікації).
 Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. А, Б – 20х; В, Г – 15х
 Препарати М.С. Козія.

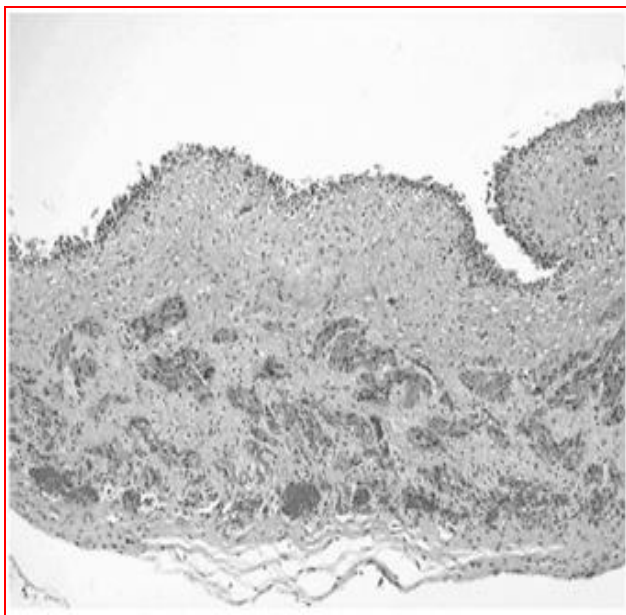


Рис. 2.6.2 – Сечовий міхур:
16-й тиждень вагітності.
Гематоксилін Бемера фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
10х.
Препарат М.С. Козія.

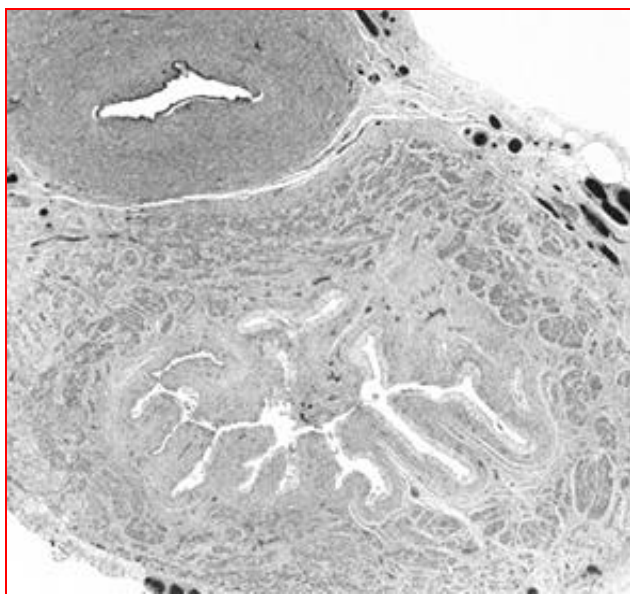


Рис. 2.6.3 – Сечовий міхур та
матка (вгорі) у 19 тижнів.
Гематоксилін Бемера фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
20х.
Препарат М.С. Козія.

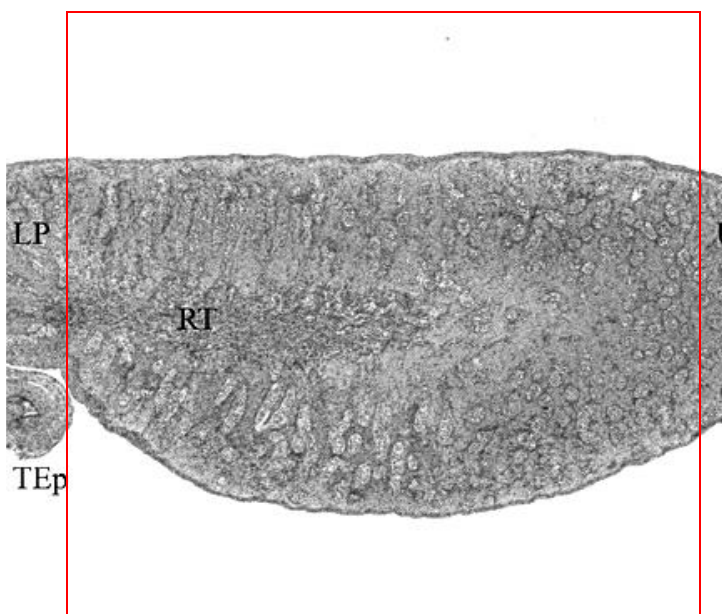


Рис. 2.6.4 – Яєчко плода на
15-м тиждні вагітності.
LP – нижній полюс яєчка; RT -
середостіння сітчастого яєчка; TEp -
хвіст придатка яєчка; UP – верхній
полюс яєчка.
Гематоксилін-еозин, 20х.
Препарат М.С. Козія.



Рис. 2.6.5 – Передміхурова залоза:
17-й тиждень вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-
2,5^x. 100х.
Препарат М.С. Козія

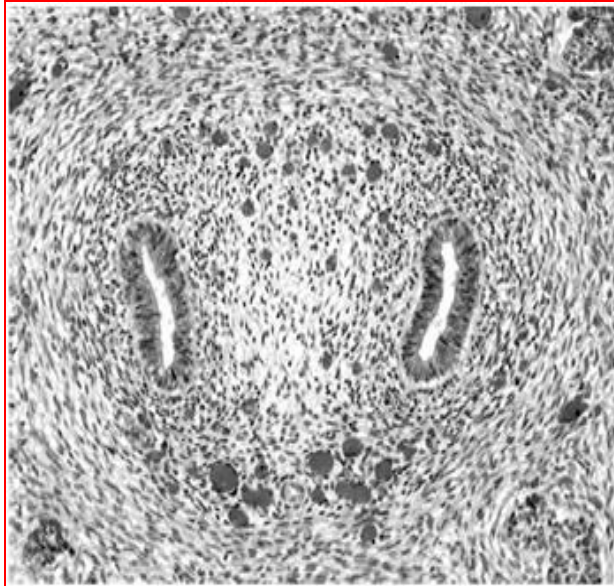


Рис. 2.6.6 – Еякуляторні протоки:
17-й тиждень вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^x. 100х.
Препарат М.С. Козія

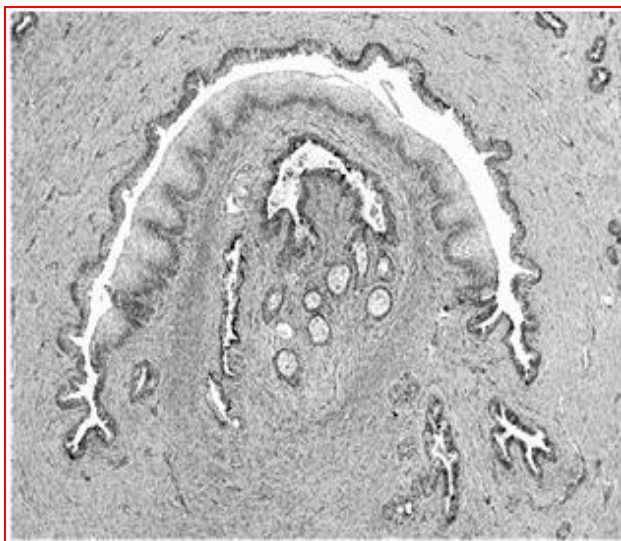


Рис. 2.6.7 – Простатична уретра з
плоскоклітинною метаплазією.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^x. 80х.
Препарат М.С. Козія

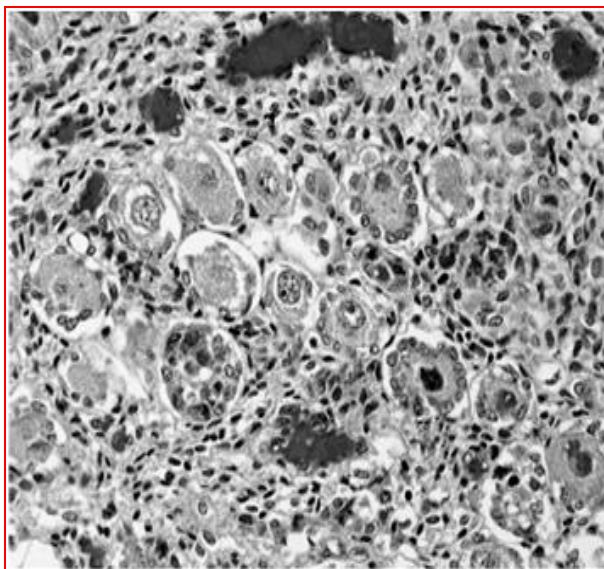


Рис. 2.6.8 – Овоцити та фолікули: яєчник на 24-му тижні вагітності. Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^x. 400х.
Препарат М.С. Козія

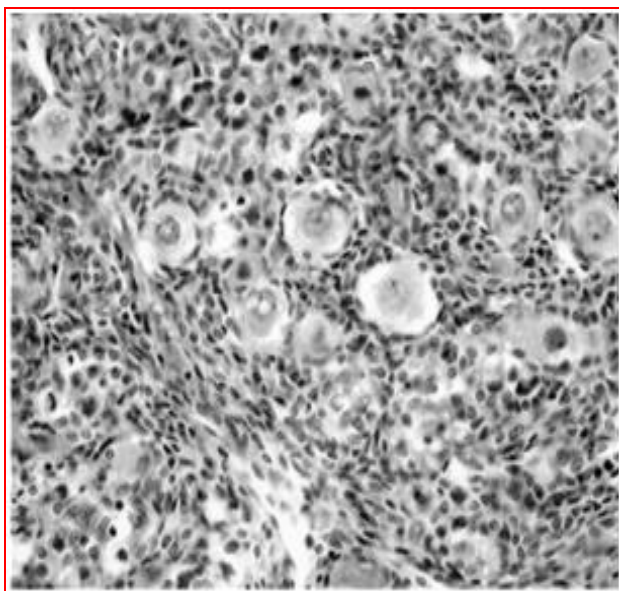


Рис. 2.6.9 – Первинні фолікули: яєчник на 28-му тижні вагітності. Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^x. 400х.
Препарат М.С. Козія

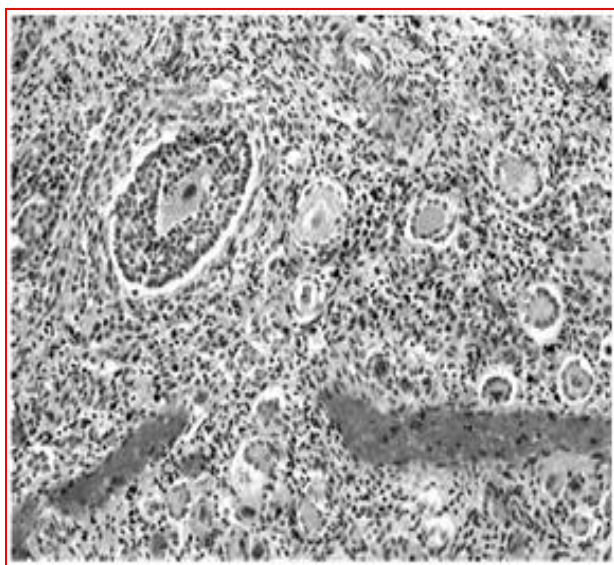


Рис. 2.6.10 – Вторинний фолікул: яєчник на 32-му тижні вагітності. Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^x. 200х.
Препарат М.С. Козія

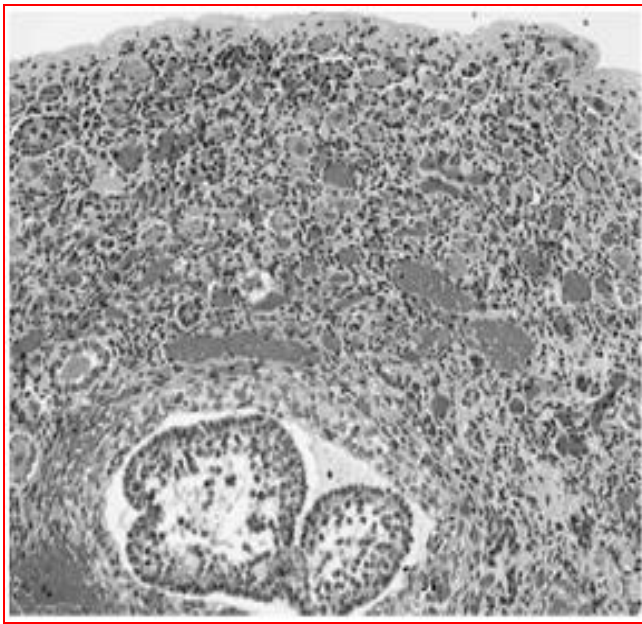


Рис. 2.6.11 – Третинний (антральний) фолікул. Яєчник на 38-му тижні вагітності. Гематоксилін, еозин. 200х. Препарат М.С. Козія.



Рис. 2.6.12 – Тіло матки: 19-й тиждень вагітності. Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації). Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. 100х. Препарат М.С. Козія.

2.7. Особливості гістологічної техніки ендокринної системи та провізорних органів

З метою досягнення найкращої безпеки ніжних компонентів тканин ендокринної системи та провізорних органів, нами рекомендована парафіново-целлоидинова заливка з наступним укладанням об'єкта в парафін-ланолін. Вдале поєднання парафін-целлоїдину та парафін-ланоліну дозволяє не лише достатньою мірою ущільнити м'які тканини, але й також добре зв'язати їх ніжні

складові. Такий підхід не тільки максимально запобігає порушенням цілісності тканин при їх різанні, але й дозволяє виконати досить тонкі зрізи.

Укладають освітлені мікропрепарати в канадський бальзам.

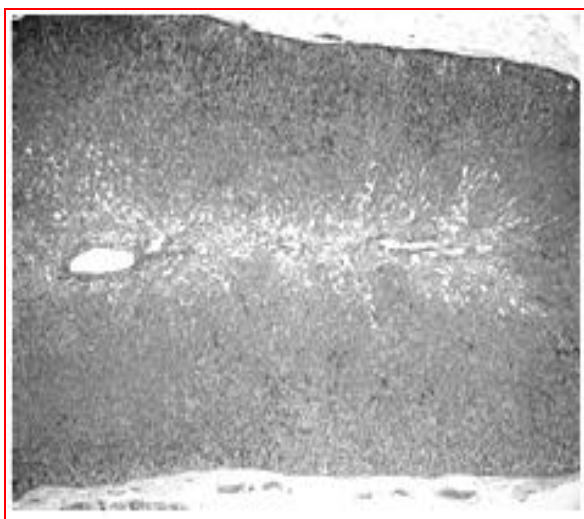


Рис.2.7.1 – Надниркова залоза:
39-й тиждень вагітності.

Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^х. 40х.

Препарат М.С. Козія.

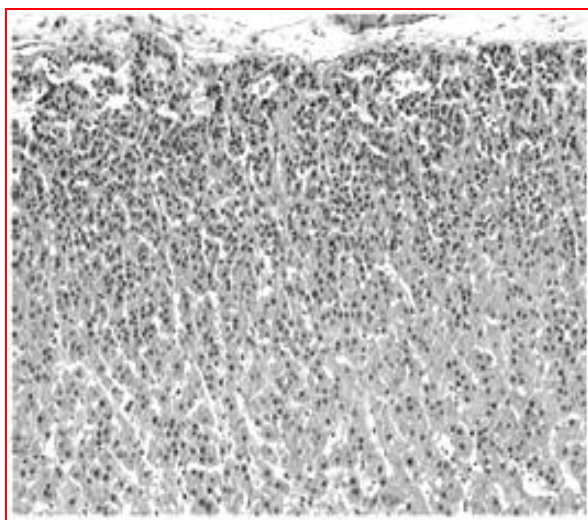


Рис. 2.7.2 – Надниркова залоза:
30-й тиждень вагітності.

Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^х. 100х.

Препарат М.С. Козія.

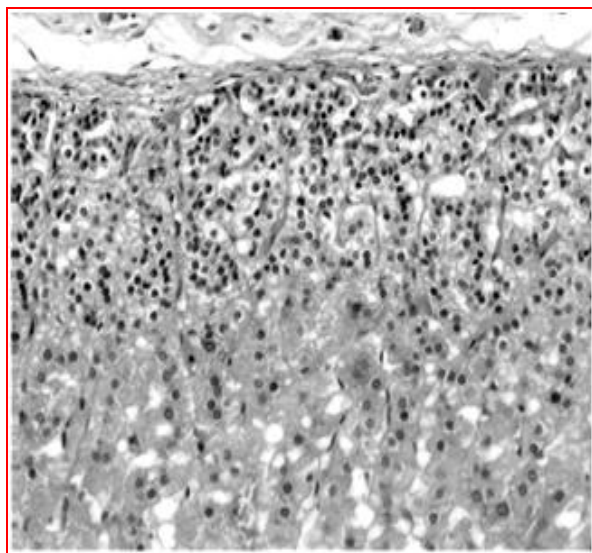


Рис. 2.7.3 – Дефінітивна зона
надниркової залози: 35-й тиждень
вагітності.

Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^х. 200х.

Препарат М.С. Козія.

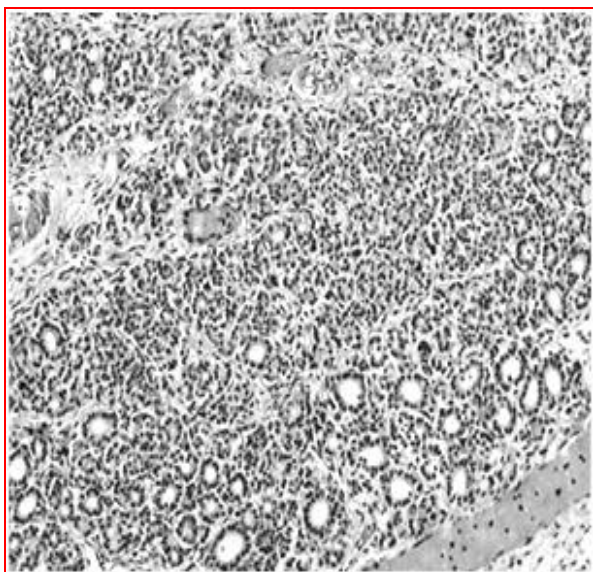


Рис. 2.7.4 – Щитоподібна залоза: 18-й тиждень вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^х. 100х.
Препарат М.С. Козія.

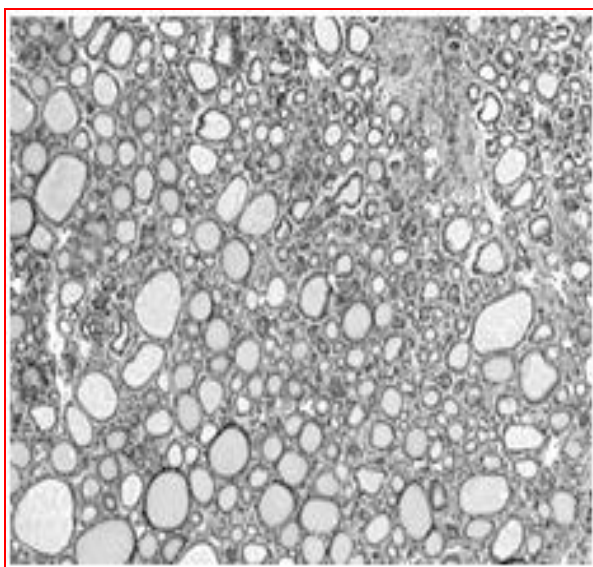


Рис. 2.7.5 – Щитоподібна залоза:
26-й тиждень вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^х. 100х.
Препарат М.С. Козія.

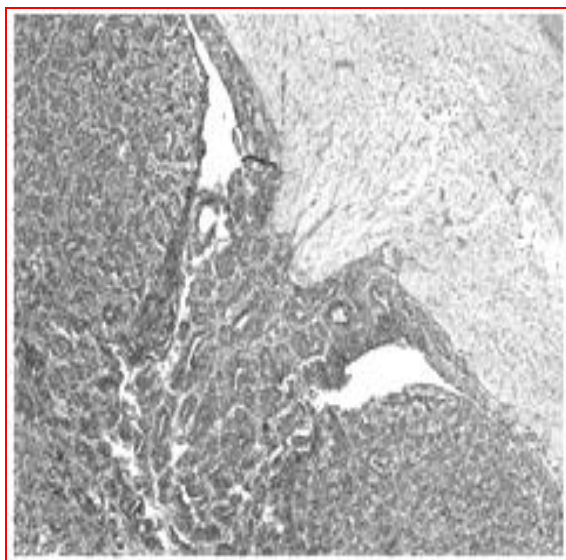


Рис. 2.7.6 – З'єднання передньої та задньої часткою гіпофіза:
26-й тиждень вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х.
80х.
Препарат М.С. Козія.

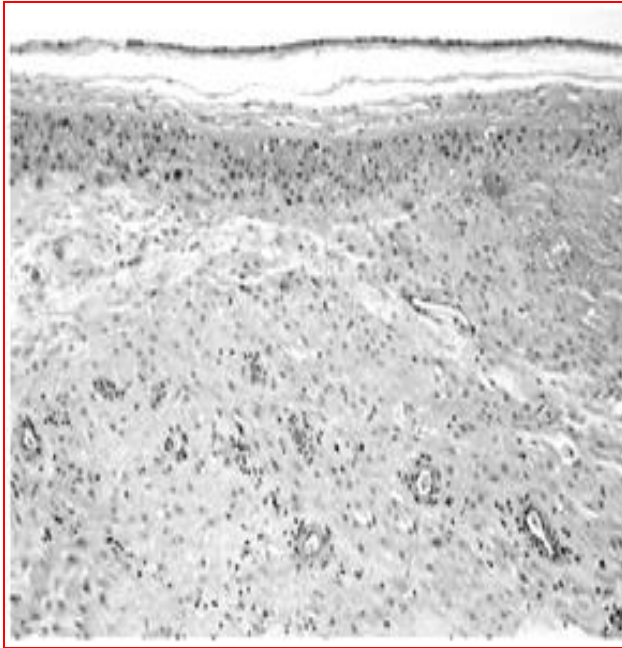


Рис. 2.7.7 – *Decidua parietalis*
наприкінці терміну вагітності.

Гематоксилін Бемера,
фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-
2,5^x. 100х.

Препарат М.С. Козія.

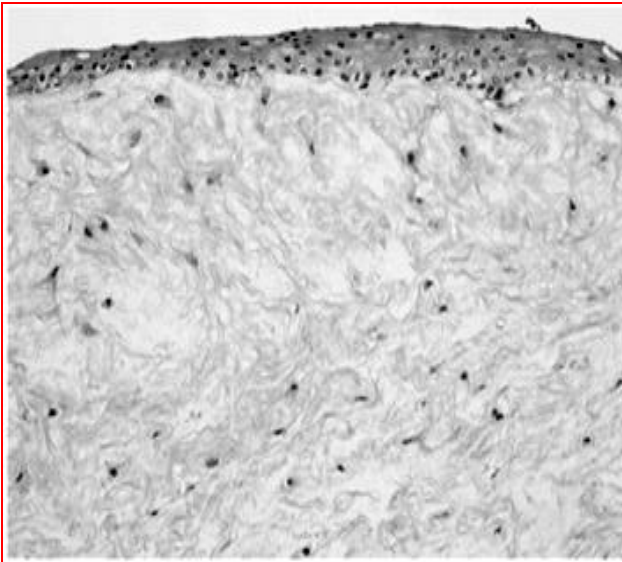


Рис. 2.7.8 – Пуповина:
36-й тиждень вагітності.

Плоскоклітинна метаблазія.

Гематоксилін Бемера,
фукселін Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр
ФГПМ-2,5^x. 100х.

Препарат М.С. Козія.

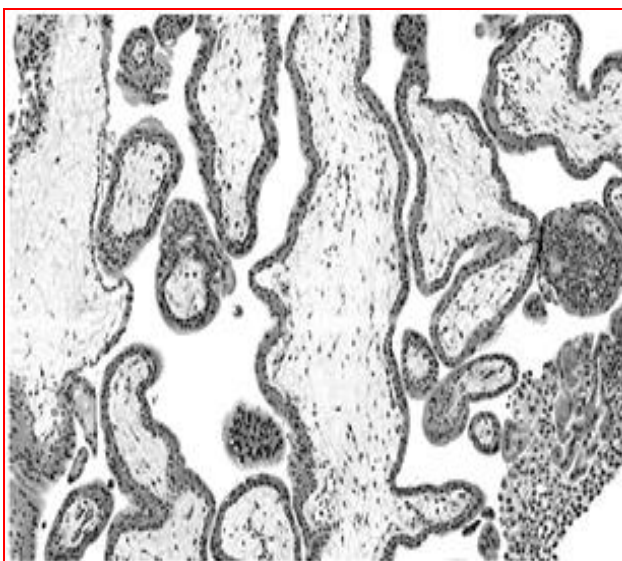


Рис. 2.7.9 – Плацентарна тканина:
6-й тиждень вагітності.

Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
50х.

Препарат М.С. Козія.

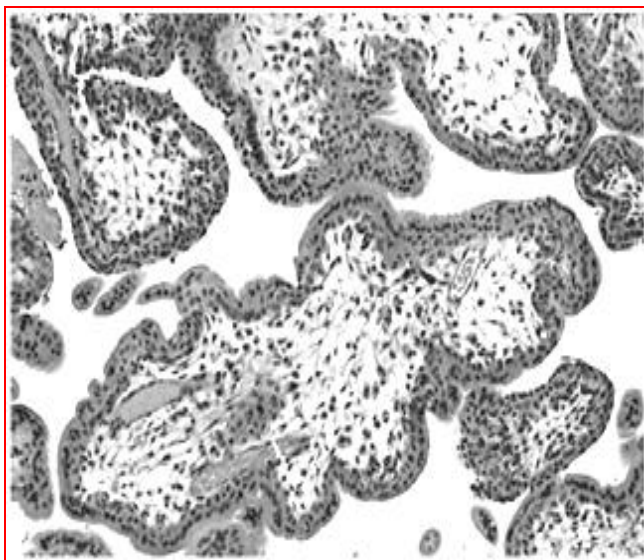


Рис. 2.7.10 – Плацентарні ворсинки:
14-й тиждень вагітності.
Гематоксилін Бемера, фукселін
Харта (у модифікації).
Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^x.
50х.
Препарат М.С. Козія.

2.8 Особливості гістологічної техніки шкіри та її похідних

До складу шкіри входять різноманітні тканини. З огляду на це, покриви тіла та їх похідні можна віднести до категорії підвищеної складності обробки. Шкірні похідні є утвореннями, подальше ущільнення яких у ході гістологічної обробки виключає їх нормальне різання на мікротомі.

Епідерміс, дерма і підшкірна клітковина мають різну щільність: неправильно обрана методика фіксації, проводки і остаточного укладання в заливальне середовище може зайво ущільнити епідерміс і в той же час незадовільно його «зв'язати» з менш щільною дермою: в результаті мікротомного різання подальшою фрагментацією тканин. Так, вибір як фіксатор 4-5% нейтрального формаліну і подальше проведення шкіри через зміни безводного ацетону з остаточною заливкою в парафін-восколіт, дають незадовільні результати.

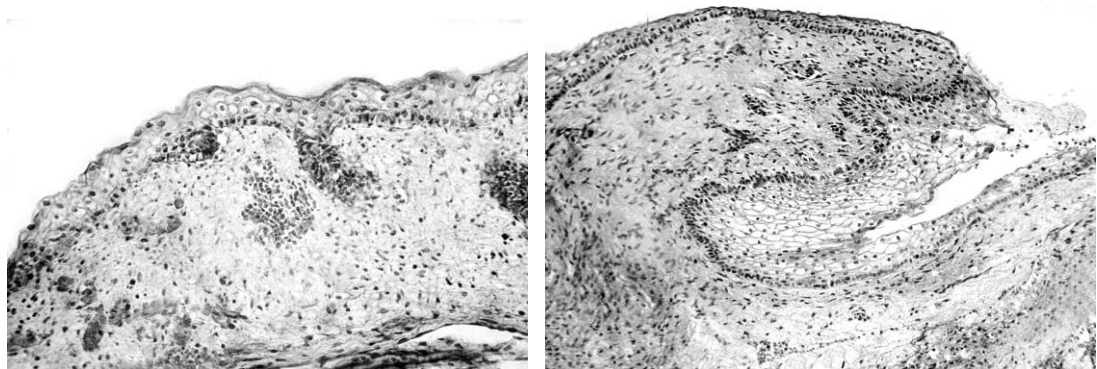
Як виняток, забір зразка шкіри можна зробити в області щоки ембріона. Шкіра щік менш щільна, ніж шкіра тулуба. У зв'язку з цим, для проведення цього матеріалу можна застосувати методику ацетонового зневоднення з подальшою заливкою парафін-восколіт. Такий підхід спрямований на досягнення ідентичної щільності заливного середовища і зразка, що

заливається, що надалі дозволить полегшити різання блоків на мікротомі. Слід пам'ятати, що ця технологія унеможлиблює отримання тонких зрізів.

Як найпоширеніші барвники тканин шкіри використовують гематоксилін Бемера або Ерліха і спиртовий розчин еозину. Вибір цих барвників обґрунтований, насамперед, тим, що зрізи шкіри можуть займати на предметному склі більшу площу. При проведенні «панорамних», або оглядових мікрозйомок, використовуються лише малі збільшення мікроскопа: для цього потрібне контрастне забарвлення, яке забезпечують вищезазначені фарби.

Товщина шарів шкіри сильно варіює. Для додаткового посилення візуального ефекту мікропрепарат після основного фарбування додатково дофарбувати фукселіном Харта. Шкірні похідні можна фарбувати так само, як шкіру, проте найбільш виразний ефект можна отримати при додатковому фарбуванні комплексним барвником (реактивом Цинзерлінга в нашій модифікації або азур-еозином за Романовським). Сутність обробки цими сумішами полягає в одночасному та селективному фарбуванні різних тканинних компонентів зрізу, при цьому результат фарбування практично один і той же: ядра – синьо-фіолетові; цитоплазма – яскраво-червона чи малинова; хрящ – синій; колаген – червоний.

Укладають освітлені мікропрепарати в канадський бальзам.



А

Б

Рис. 2.8.1 – Шкіра плода. 32 тиждень.

А – щока; Б – губа.

Гематоксилін Бемера, фукселін Харта (у модифікації).

Коригуючий фільтр ФГПМ-2,5^х. X50, X50.

Препарати М.С. Козія.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено комплекс нових технологічних прийомів та методів гістологічної обробки тканин та ембріонального матеріалу.

2. З метою оптимізації процесу та підвищення якості фіксації тканин запропоновано нові склади та прописи складних фіксуючих сумішей, встановлені оптимальні значення концентрації реагентів у простих та складних фіксаторах.

3. Розроблено пристрій для щадного промивання ембріональних тканин, що забезпечує їх максимальне збереження.

4. Доведена ефективність прискорення дегідратації тканин безводним ацетоном та метанолом за допомогою термічного способу.

5. Експериментально доведено перевагу використання псевдо-кумолу як інтермедіатора (освітлювального агента).

6. Розроблені нові склади заливальних сумішей для отримання тонких (2,0-3,0 мкм) зрізів. Експериментально доведена ефективність їх використання у широкому температурному діапазоні.

7. Запропоновані нові методи ацетонового зневоднення та комбінованої (парафіново-целоїдинової) заливки тканин. Простежена залежність швидкості та ступеня зневоднення, а також якості заміщення парафіном від фіксованої товщини гістологічного об'єкта.

8. Розроблено пристрій для заливання до парафіну (парафін-целоїдин) малих кількостей гістологічного матеріалу.

9. Доведено залежність ступеня ущільнення тканин від часу їх утримання в активних середовищах.

10. Розроблені та науково обґрунтовані теоретичні аспекти процесу різання тканин.

11. Розроблено модель аркового мікротому, що дозволяє значно полегшити процес різання парафінових (парафін-целоїдинових) блоків та нефіксованого матеріалу.

12. З метою оптимізації процесу фарбування тканин, модифіковані прописи карміну Майєра та реактиву Цинзерлінга.

13. Розроблено новий спосіб одержання мікрошліфів кісткового матеріалу, що спрощує процес гістологічного контролю.

НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для посилення проникаючої здатності та досягнення мінімальної деформації матеріалу, рекомендовано використання 4-5% розчину формаліну та фіксатора Буена у складі: розведений формалін (10%), пікринова кислота (7,0 мл), крижана оцтова кислота (9,0 мл).

2. Промивання ембріонального матеріалу доцільно проводити у двокамерному бюксі.

3. Тканини повинні оброблятися з урахуванням зменшення товщини гістологічного об'єкта до 1,0-1,5 мм; підвищення температури технологічних операцій на 5-10°C; зневоднення за допомогою метилового спирту; підвищення лабільності заливного середовища за методом: «касторове масло+1%ефірно-спиртовий розчин целоїдину (1:1)»; досягнення пластичності заливальної суміші «парафін (75-80%)+ланолін (20-25%)».

4. З метою досягнення кращої збереженості зрізу, необхідно: тканинному блоку надати форму правильного паралелепіпеда або усіченої чотиригранної піраміди; різання блоку доцільно виконувати на арковому мікротомі, з урахуванням його «крайової» орієнтації щодо кромки ножа; розправку зрізу необхідно проводити в підігрітій воді з додаванням 30-40 мл 70% етанолу; фіксацію зрізу на предметному склі рекомендовано проводити за допомогою суміші яєчного білка та синтетичного гліцерину (3 частини на 2 частини); сушіння зрізів проводити за «пасивним» способом, при 20-25°C;

5. В якості альтернативного розчинника парафіну та освітлювача зрізу рекомендується використання псевдо-кумол;

6. Для досягнення оптимального фарбування ядра, цитоплазми та клітинних меж рекомендовано комплексні барвники: спиртовий кармін Майєра в модифікації (кармінова кислота (2,0 г), хлористий алюміній (1,0 г), хлористий кальцій (4,5 г), 96%- й етанол (100,0 мл), саліцилова кислота (0,5 г)); реактив Цинзерлінгу в модифікації (хромосмон, насичений розчин на 96-100% етанолі (30,0мл), 96% етанол (300,0 мл), основний фуксин (2,0 г), резорцин (4,0 г), 5%

розчин FeCl_3 (25,0 мл), 0,01% розчин KOH (100,0 мл), HCl _(конц.) (4,0 мл), вода дистильована (200,0 мл).

7. З метою отримання якісних та тонких зрізів кісткового матеріалу, рекомендовано їх вертикальну фіксацію, заливання за допомогою зуботехнічного восколіту та подальше шліфування заготовки з двох протилежних сторін.

8. Для досягнення швидкої дегідратації та якісної заливки в ущільнювальне середовище ембріонального матеріалу доцільно використання діетилендіоксиду (діоксану).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гусельников Є.П. Вібраційний мікротом. Опис винаходу до авторського свідоцтва № 134895. Київ: 1981.
2. Козий М.С. Эмбриональные ткани: усовершенствование методик и гистологической обработки // Таврійський науковий вісник. – 2012.-№21. – С.75-78.
3. Козий М.С. Мікротом. Патент на винахід № 50266А від 15.10.2012 р. (бюл. №10).
4. Козий М.С. Спосіб заключення в парафін гістологічних об'єктів з фіксованою товщиною. Патент на винахід №64288 А. від 16.02.2014 р. (бюл. №2).
5. Козий М.С., Шерман І.М., Корнієнко В.О. та ін.. Спосіб комбінованого залиття тканин гідробіонтів. Патент на корисну модель №15588 від 17.07. 2006 р. (бюл. №7).
6. Козий М.С., Ляшенко Є.В. Спосіб одержання заливного парафіну. Патент на корисну модель №26010 від 27.08.2007 р. (бюл. №8).
7. Ляшенко Є.В., Самойлюк В.В., Козий М.С. Спосіб проведення біопсії новоутворень. Патент на корисну модель №17955 від 16.10.2016 р. (бюл. №10).
8. Ляшенко Є.В., Самойлюк В.В., Козий М.С., Куцак Р.С. Спосіб експрес-діагностики новоутворень у м'ясоїдних. Патент на корисну модель №20234 від 15.01.2017 р. (бюл. №1).
9. Прутько В.Г. Про вік та зростання діафа екваторіальної частини Індійського океану // Вісник зоології, 1997. – Т.27. – С. 478-487.
10. Скупченко В.Б. Вібраційний мікротом для різання м'якої тканини. Опис винаходу до авторського свідоцтва № 459686 G 01 n 1/06. – Київ: 1995.
11. Aherne G. Uber nene, rachh auszufuhrende verfahren fur Zellgrossenmessungen. Acta Anat., 1999. – Т.28. – V.3. – 177 p.
12. Anderson N.G. Techniques for the mass isolation of cellular component. Acad. Press., New York, 1999. – V.3. – P.172.

13. Apati A. Einführung in die mikroskopischen Untersuchungsmethoden. Acad. Verl. Leipzig, 1995.
14. Bensley R.R., Bensley S.A. Handbook of histological and cytological. Chicago University of Chicago Press, 1950. – 362 p.
15. Bögréné V., Bodrogi G., Kis A. Kacsatojások keltetéalatti esetsavss kezelésének hatása a keitethetősédre. Baromfitenyésztéa Feldolgozás. – 1988.
16. Burstone M.S. Enzyme histochemistry and ist application in the study of neoplasms. Acad. Press., New York. 1985.
17. Cameron G. Tissue culture technique. Acad. Press., New York, 1980. – V.1. –P.67-69.
18. Caseimann W.G.B. Histological technique. London. Bulter and Tanner, 1999. – 300p.
19. Casselman W.G.B. Histochemical Technique. Methuen, London, 1969. – V.66. – P. 12-29.
20. Chillaber C.R. Photomicrography in theory and practice // J. Wiley and Sons. New York – London, 1979.
21. Coons A.H. Histochemistry with labeled antibody // J. Wiley and Sons. New York – London, 1983.
22. Danielli J.F. Cytochemistry a critical apporoach / Internat. Rev. Cytol. 1976. – V.5. – №1. – P. 25-29.
23. Elledor M. Prolonged methanol fixation of soluble micro substances // Histoshemistry, 1986. – V.46. – № 2. – P. 161-165.
24. Enesco M., Leblond C. The Morphology experimental // Embryology, 1962. – V.10. – 530 p.
25. Engstrom A. Historadiography // Physical techniques in biological research. Acad. Press., New York, 1986. – V.3. – 489 p.
26. Eranko O. Quantitative Methods in Histology and Microscopic Histochemistry. Bazel – New York, 1955.
27. Erlich E. Enzyklopedie der mikroskopischen Technik. Urban – Schwarzenberg, Wien, 1910.

28. Frank W. Möglichkeiten der Herstellung von Gewebsschnitten ohne Frierprozess und Einbettung des Gewebes. "Microscopie", 1971. – bd. 27. – P. 80-84.
29. Futaesaru Y. New fixation for biological membranes using tannic acids. Acta histochem. et cytochem, 1992. – V.5 – P. 233-236.
30. Gerch I. Fixation and staining in the cell. Acad. Press., New York, 1999. – V.1. – 121 p.
31. Glick D. Quantitative chemical techniques of histo- and cytochemistry. Interscience, London-New York, 1961–1963. – V.1-2.
32. Gomori G. Microscopy histochemistry // University of Chicago Press, 1992. – 265 p.
33. Grecnich H.G. Text-book of material medica. London, 1999.
34. Groble A. Histologische Technik. W. Mandrich, Wien, 1980.
35. Hammar F. Ueber Methoden, die Größe und Anzahl der Hassallschen Körper der Menschenthymus Zahlenmäßig Festzustellen, nebst einigen Worten über das numerische «Körpuscelproblem» überhaupt, Z, mikr, anat, F., 1976. – №6. – 399 p.
36. Hopwood J.A. Fixatives and fixation a review / Histochem. and Cytochem., 1989. – V.1. – P. 326-360.
37. Kirk P.L. Quantitative ultra microanalysis // J. Wiley and Sons. New York – London, 1980. – 172 p.
38. Kirk-Othmer encyclopedia. 3ed., – V.24. – N. Y., –1984. – P. 709.
39. Kiszely G. Gyakoplatti mikrotechnika és histokémia. Budapest, Medicina Könyvkiadó, 1958. – 400 p.
40. Kopac M.J. Microsurgical studies on living cell. Acad. Press., New York, 1999. – V.1. – 161 p.
41. Kovach E.A. Kísérleti orvostudomány vizsgálati módszerei. Budapest, Medicina Könyvkiadó, 1990. – V.15. – 48 p.
42. Langeron G. Précis de microscopie. Masson – Paris, 1999.
43. Leblond C.P. Classification of cell population on the basis of their proliferation behavior // Nat. Canz. Inst., 1984. – V.14. – 119 p.

44. Lizon L. Histochemic et cytochemic animal. Paris. Gauthier-Villars, 1990. – 361p.
45. Mallory R. Pathological Technique. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1938.
46. Mc Clung C.E. Handbook of microscopically technique. New York. Paul B. Holber, 1990. – 287 p.
47. Mc Ilwain H., Buddl H.L. Technigues in tissue metabolism. A mechanical chapper // “Biochem J.“, 1973. – № 53. – P. 412-420.
48. Mc Manus J.F., Mowry R.W. Staining Methods Histological and Histochemical. Hoeber, New York, 1980.
49. Nedzel J. Quart .J. Micr. Sci. – №92. – 1951. – 343 p.
50. Needman J. Biochemistry and morphogenesis. London. Cambridge University Press, 1938. – 322 p.
51. Parker P.C. Methods of tissue culture. New York. Paul B. Holber, 1991. – 124 p.
52. Peace D.C. Histological technique for light microscopy. Acad. Press., New York, 1993. – V.7. – P. 61-75.
53. Peterfi H. Methodik der vissenschaftlichen Biologie. Springer. Wien, 1988.
54. Roulet G. Methoden der patologischen Histologik. Springer. Berlin, 1988.
55. Sabatini D.D., Bensch K.G., Barnett R.J. New fixatives for cytological and cytochemical studies // Firth International Congress on microscopy. Acad. Press., New York, 1992. – V.2. – L.3. – P. 67-72.
56. Sims B. A simple method of preparing 1-2 mkm section of large tissue blocks using glycol metacrilate // Microscopie. 1994. – V.101. – P. 223-227.
57. Smith R.E. Comparative evaluation of the instruments and procedures to cut nonfrozen sections // “J. Of Histochemistry and Cytochmistry”, 1990. – V.18. – № 8. – p. 590-591.

58. Smith R.E., Farguhar M.G. Preparation of thick section for cytochemistry and electron microscopy by a nonfreezing technique // "Nature", 1983. – V. 200. – P. 691-694.
59. Spanuhov L. Ein fuhrung in die Praxis der Histochemie. Jena, G. Fischer Verlag, 1997.
60. Sterba G.G.Überlebende histologische Gevebeschnitte // "Experimentia", 1987. –V. 13. – P. 335-337.
61. Szuks I. Az ep-es koros szovettani vizsgalat modszeri. M.O.K.T., Budapest, Medicina Konyvkiado, 1996.
62. Tschirch A. Handbuch d. Pharmakognosie, Bd. 2, Lpz., 1989.
63. Uolita M., Kannas O. Qantitative histolohical method of determining the proportion of the principal components of thipoid tissue. Acta Enaber., 1982. – V.7. – 49 p.
64. Weibel E., Knight B. A morhometric study of the thickness of the cytology // Cell Biol., 1994. – V.21. – 367 p.
65. Xippel J.M., Gladwinn R.C. The use of a low-viscosity epoxy resin in the preparation of undecalcified bone sections for light microscopy // Microscopy. Gr. Brit., 1992. – V.96. – P. 125-129.

ДОДАТОК

ВИРІЗКА ТКАНИННИХ БЛОКІВ ДЛЯ ГІСТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Нижченаведений опис являє собою короткий загальний посібник для належного відбору зразків тканин при розтині. Незалежно від стану органу, що відповідає нормі або мацерації, вирізка має бути отримана наступним чином:

I. Голова та шия

А. Язик, під'язикова кістка та надгортанник. Сагітальний розріз основи язика по середній лінії, включаючи отвір сліпої кишки.

Б. М'які тканини шиї, гортань, верхній відділ стравоходу, щитовидна залоза та навколощитовидні залози. Послідовні поперечні перерізи з інтервалами в 3 мм від усієї гортані та щитовидної залози.

II. Дихальна система

А. Трахея. Поздовжній розріз дистального відділу трахеї, кіля та основного ствола бронхів.

Б. Легені. Одна секція кожної частки, включаючи грудну клітину, головний бронх, периферичні ділянки легеневих мішків та плевру.

III. Серцево-судинна система

А. Серце. 1. Нормальне серце: один поздовжній розріз кожного шлуночка, включаючи папілярний м'яз, вільну стінку повної товщини, атріовентрикулярний клапан та основу передсердя. 2. Аномальне серце: зрізи правого та лівого шлуночків уздовж розрізів, зроблених для огляду камер. Зразок зберігається для демонстрування і має бути якомога неушкодженим.

Б. Аорта (за потреби).

IV Травна система

А. Стравохід та шлунок. 1. Поздовжній розріз дистального відділу стравоходу та проксимального відділу шлунка через з'єднання G-E та поперечні розрізи дистального та проксимального відділу стравоходу. 2. Поперечний

переріз тіла шлунка. 3. Поздовжній розріз антрального відділу шлунка та дванадцятипалої кишки через пілорус.

Б. Малий та товстий кишечник. Випадкові перерізи, якщо жодних пошкоджень не видно. Включити у вирізку ілеоцекальний клапан.

В. Пряма кишка. Поздовжній розріз прямої кишки з анальною шкірою, якщо є. Поперечний переріз дистального кінця прямої кишки та прикріпленої простати (або піхви) прийнятно також.

Г. Печінка. Одна секція від кожної частки (жовчний міхур може бути увімкнений, щоб ідентифікувати праву частку).

Д. Підшлункова залоза. Одна частина головки включає суміжну дванадцятипалу кишку, а також один або два поперечні перерізи тіла і хвоста.

V. Органи сечостатевої системи

А. Нирки. Одна секція кожної нирки, що включає, принаймні, одну добре орієнтовану медулярну піраміду з сосочками і корою (ниркова частка).

Б. Сечовий міхур. Смуга слизової сечового міхура і стінки. Включити перетин передміхурової залози.

В. Матка. Поперечний переріз дна та поздовжній середній сагітальний розріз шийки матки та піхви (якщо на поперечному розрізі не видно розшарування).

Г. Яєчники. Поздовжній розріз, включаючи широкий зв'язок.

Е. Насінники. Поздовжній розріз, включаючи епідідіміс.

VI. Лімфоретикулярна система

О. Селезенка та тимус Одна секція кожного.

Б. Лімфатичні вузли. Зразок при необхідності, відповідно до загальними морфологічними даними. Для рутинного взяття проб лімфатичних вузлів хорошим джерелом є брижа тонкої кишки.

VII. Ендокринна система

А. Щитоподібна залоза та парашитоподібна залоза. Зазвичай не відокремлені від гортані та трахеї.

Б. Надниркові залози. Один поперечний переріз кожної залози, перпендикулярно довгій осі для кращої орієнтації кори та мозкової речовини.

В. Гіпофіз. Зазвичай представлений у межах *sella turcica*. Бажано виконати один поперечний розріз передньої і задньої частки.

VIII. Кістково-м'язова система

А. Діафрагма. Поздовжні та поперечні перерізи.

Б. Ребро та тіло хребця. Поздовжній розріз ребра, включаючи костохондральне зчленування та середньосагітальний розріз тіла хребця. Декальцинувати дуже обережно протягом мінімального періоду часу.

Наукове видання

Михайло Степанович Козій,
Вячеслав Володимирович Самойлюк

ГІСТОЛОГІЧНА ТА ЕМБРІОЛОГІЧНА ТЕХНІКА
Монографія

Відповідальний за випуск – Портненко Денис
Комп'ютерна верстка – Тумін Сергій

Підписано до друку: 21.05.2025 р.
Формат 60х84/16. Папір офсетний. Друк цифровий.
Обл.-вид. арк. 13,25. Ум.-друк. арк.12,3.
Наклад: 50 прим. Зам. № 32

Видавництво «Журфонд»
49001, м. Дніпро, вул. Старокозацька, 8
Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
ДК № 684 від 21.11.2001 р.

Віддруковано: Друкарня «Franklin»
050 724 91 77
www.tipografia-franklin.com.ua
Instagram: franklin_cntr_p
пр. Д. Яворницького, 94, м. Дніпро, 45000

Козій М.С., Самойлюк В.В.
К59 Гістологічна та ембріологічна техніка: Монографія. /Наукове
видання/ – Дніпро, Журфонд, 2025. – 212 с.

ISBN 978-966-934-680-3

Наводяться результати експериментальних досліджень, дається об'єктивна оцінка існуючим та інноваційним методам гістологічної та ембріологічної техніки органів та тканин людини.

Значну увагу приділено теоретичним принципам препарування, заливання, мікротомування та отримання постійних гістологічних та ембріологічних препаратів.

Запропоновано нові методи ацетонового зневоднення, комбінованої (парафін-целоїдинової) заливки, мікротомування, прогресивного фарбування, освіт-лення та укладання м'яких тканин, а також декальцинації та отримання мікрош-ліфів кісткового матеріалу.

УДК 576.3.59.8:612.014.1