

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

**Подготовка материала
для гистологического исследования
и электронной микроскопии**

Руководство

Под редакцией Д. Э. Коржевского

Санкт-Петербург
СпецЛит
2013

УДК 611.018.1
М80

Авторы:

Коржевский Дмитрий Эдуардович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Гилерович Елена Георгиевна — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Кирик Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Сухорукова Елена Геннадьевна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Григорьев Игорь Павлович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН

Рецензент:

Иванов Игорь Николаевич — доктор медицинских наук, профессор кафедры судебной медицины ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова»

Морфологическая диагностика. Подготовка материала
М80 для гистологического исследования и электронной микро-
скопии : руководство / под ред. Д. Э. Коржевского. — СПб. :
СпецЛит, 2013. — 127 с.

ISBN 978-5-299-00569-1

В руководстве кратко изложен материал, необходимый для освоения современных методов гистологического и ультраструктурного исследования. Приведены сведения о теоретических основах используемых методов и практических приемах, часть из которых разработана и усовершенствована авторами издания.

Справочное пособие предназначено для специалистов, применяющих в своей работе различные методы гистологического исследования и электронную микроскопию (врачей-патологоанатомов, неврологов, гематологов, бактериологов, судебно-медицинских экспертов и научных работников), а также будет полезно для студентов биологических и медицинских факультетов, изучающих соответствующие дисциплины.

УДК 611.018.1

© Коржевский Д. Э., Гилерович Е. Г.,
Кирик О. В., Сухорукова Е. Г.,
Григорьев И. П., 2013

ISBN 978-5-299-00569-1

© Издательство «СпецЛит», 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

Принятые сокращения	6
Предисловие	7

Раздел I

Подготовка материала для гистологического исследования

<i>Глава 1. Фиксация материала для гистологического исследования</i> <i>(Д. Э. Коржевский)</i>	10
1.1. Общие положения	10
1.2. Фиксация материала для световой микроскопии	11
1.2.1. Ацетон	12
1.2.2. Этанол	12
1.2.3. Сложные фиксирующие жидкости, содержащие этанол	14
1.2.4. Метанол	16
1.2.5. Изопропанол	16
1.2.6. Уксусная кислота	17
1.2.7. Формалин	17
1.2.8. Пикриновая кислота и жидкость Буэна	20
1.2.9. Другие фиксаторы общего назначения	22
1.3. Фиксация материала для иммуноцитохимического исследования	22
<i>Глава 2. Декальцинация костной ткани (Д. Э. Коржевский)</i>	26
2.1. Общие сведения о декальцинации	26
2.2. Кислотная декальцинация	27
2.3. Декальцинация при иммуногистохимическом исследовании	28
2.4. Контроль эффективности декальцинации	29
<i>Глава 3. Обезвоживание объектов и заливка в парафин</i> <i>(Д. Э. Коржевский)</i>	30
3.1. Обезвоживание материала	30
3.2. Заливка объектов в парафин	32
3.3. Применение целлоидина при заливке в парафин	35
<i>Глава 4. Изготовление срезов и их наклейка (Д. Э. Коржевский,</i> <i>О. В. Кирик)</i>	37
4.1. Изготовление срезов	37
4.2. Подготовка предметных стекол	38
<i>Глава 5. Подготовка срезов к окрашиванию и заключение</i> <i>гистологического препарата (Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик)</i>	43
5.1. Депарафинирование и регидратация срезов перед окраской	43
5.2. Дегидратация, просветление и заключение срезов после окраски	45

<i>Глава 6. Красители, используемые в гистологии и цитологии (Д. Э. Коржевский)</i>	47
6.1. Гематоксилин	48
6.1.1. Квасцовые гематоксилины	49
6.1.2. Железные гематоксилины	52
6.2. Эозин и обзорные методы окраски	54
6.2.1. Обзорная окраска препаратов гематоксилином и эозином	55
6.2.2. Обзорная окраска азур-эозином	56
<i>Глава 7. Специальные методы окраски, используемые для изучения структур клеточного ядра (Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик)</i>	59
7.1. Реакция Фельгена	59
7.2. Выявление ядрышек в интерфазных клетках при помощи метода AgNOR	60
7.2.1. Импрегнационный метод выявления ядрышек в ядрах клеток разных тканей	62
7.2.2. AgNOR-метод, рекомендуемый для парафиновых срезов и фиксированного в формалине материала	64
7.3. Выявление структурных изменений ядра, характерных для апоптоза	65
<i>Глава 8. Методы окраски соединительной ткани (Д. Э. Коржевский)</i>	69
8.1. Окраска препаратов по Ван-Гизону	69
8.2. Окраска соединительной ткани по методу Маллори	70
8.3. Окраска соединительной ткани по Маллори в модификации Слинченко	71
8.4. Выявление эластических волокон	72
<i>Глава 9. Специальные методы окраски (Д. Э. Коржевский, Е. Г. Сухорукова)</i>	74
9.1. Выявление фибрина методом ОКГ по Зербино	74
9.2. Выявление повреждений миокарда по Ли (1971) – ГОФП	75
9.3. Окраска хроматофильной субстанции нервных клеток по Нисслю	76
9.3.1. Окраска нервных клеток по Нисслю крезидиновыми фиолетовыми	76
9.3.2. Окраска нейронов по методу Ниссля в авторской прописи	77
9.3.3. Окраска нейронов по методу Ниссля готовым красителем (толуидиновый синий («БиоВитрум»))	78
9.4. Окраска миелиновых волокон	79
9.5. Окраска микроорганизмов метиленовым синим Лефлера	80
9.6. Окраска микроорганизмов по Граму – Вейгерту	81
9.7. Окраска микобактерий карболовым фуксином по Цилю – Нильсену	82
<i>Глава 10. Гистохимические методы окрашивания гистологических препаратов (Д. Э. Коржевский, Е. Г. Сухорукова)</i>	85
10.1. Выявление включений амилоида	85

10.1.1. Окраска амилоида по Беннхольду	85
10.1.2. Окраска амилоида толуидиновым синим	86
10.1.3. Флуоресцентные методы выявления амилоида	86
10.2. Выявление металлов	87
10.2.1. Выявление соединений железа (III) по Перлсу	87
10.2.2. Выявление соединений меди по Хоуэлу	88
10.2.3. Выявление соединений свинца	89
10.3. Выявление гемоглобина и гемоглобинуричных пигментов	90
10.4. Выявление нейтральных жиров жирорастворимыми	
красителями	91
10.4.1. Выявление нейтральных жиров по Чиффеле и Путту	91
10.4.2. Выявление нейтральных жиров по Лилли и Ашберну	92
10.5. Выявление углеводов и мукополисахаридов	93
10.5.1. Выявление гликогена по Мак-Манусу	93
10.5.2. Выявление слизи альциановым синим	94
10.6. Комбинированная окраска тучных клеток и эозинофильных	
лейкоцитов по Сухоруковой и Ворончихину	95

Раздел II

Подготовка материала для электронной микроскопии

<i>Глава 11. Введение в электронную микроскопию (И. П. Григорьев)</i>	98
<i>Глава 12. Особенности подготовки материала для электронно-микроскопического исследования (Е. Г. Гилерович)</i>	102
12.1. Фиксация материала	102
12.2. Дополнительная (вторичная) фиксация материала	103
12.3. Проводка материала	104
12.4. Приготовление растворов для фиксации и постфиксации	107
<i>Глава 13. Ультратомы и техника изготовления срезов (О. В. Кирик)</i>	110
13.1. Получение полутонких срезов	110
13.2. Ультратонкие (тонкие) срезы	112
13.2.1. Нож для ультратомии	112
13.2.2. Получение ультратонких срезов	115
13.3. Извлечение срезов	117
<i>Глава 14. Окрашивание и контрастирование (Е. Г. Гилерович, О. В. Кирик)</i>	119
14.1. Окрашивание полутонких срезов	119
14.2. Контрастирование ультратонких срезов	120
14.3. Приготовление растворов для контрастирования срезов	121
Приложения	
<i>Приложение 1. Лабораторный менеджмент: организация рабочего процесса в гистологической лаборатории</i>	123
<i>Приложение 2. Таблица растворимости красителей</i>	126

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

БСА	– бычий сывороточный альбимин
ГОФП	– гематоксилин-основной фуксин-пикриновая кислота
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ОКГ	– оранжевый, красный, голубой
СФУ	– спирт-формалин-уксусная кислота
ШИК	– шифф-йодная кислота
EDTA	– этилендиаминтетрауксусная кислота
DDSA	– додециловый ангидрид янтарной кислоты
DMP-30	– 3-диметиламинометилфенол
MNA	– метиловый эфир надовой кислоты
PI	– пропидия иодид

ПРЕДИСЛОВИЕ

Среди современных методов лабораторной и клинической диагностики морфологические методы по праву занимают одно из первых мест благодаря своей информативности и диагностическому значению. К ним относятся методы, применяемые при гистологической и цитологической диагностике в онкологии, гематологии, неврологии, патологической анатомии и судебной медицине, а также многочисленные методы лучевой диагностики, которые не рассматриваются в настоящей книге. В отдельных случаях точный диагноз не может быть установлен без использования ультраструктурного исследования (электронной микроскопии). Иногда может оказаться полезным и применение специальных методов микроскопии — поляризационной, флуоресцентной и конфокальной лазерной. Все эти морфологические методы используются и при проведении научных исследований для разработки адекватных биологических моделей заболеваний человека и создания новых лекарственных препаратов и технологий, предназначенных для лечения моделируемых заболеваний.

В связи с высокой информативностью и исключительной иллюстративностью морфологические методы исследования достаточно широко используются не только специалистами — гистологами и патологоанатомами, профессиональная подготовка которых предусматривает детальное изучение гистотехнологии и основ ультраструктурного исследования, но и врачами, а также научными работниками других специализаций. В этих случаях как у клиницистов, так и у научных работников иногда возникает необоснованное впечатление о простоте использования гистологических методов и легкости получения необходимой информации с их помощью. Тем не менее некоторые гистологические методы достаточно сложны даже для опытного специалиста-морфолога (современные методы электронной микроскопии, иммуноцитохимии, конфокальной лазерной микроскопии). Поэтому одной из главных задач настоящего руководства является ознакомление специалистов различных профилей с ключевым разделом гистологического и электронно-микроскопического исследования — пробоподготовкой. Без адекватной пробоподготовки невозможно получить содержательные результаты высокого качества, пригодные для диагностики и научных целей. Именно на этом этапе исследования делают большинство ошибок

начинающие специалисты и формируется подавляющее большинство артефактов, способных ввести в заблуждение даже опытных аналитиков.

В представленном руководстве обобщен опыт ведущих отечественных и зарубежных специалистов в области гистологической техники и гистотехнологии. Многие из представленных протоколов в настоящее время используются при проведении исследований, выполняемых в лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы в Институте экспериментальной медицины (ИЭМ). Часть из приведенных в настоящем издании сведений отражает многолетний опыт ведущей отечественной гистологической школы, созданной Николаем Григорьевичем Хлопиным и Владимиром Павловичем Михайловым, который бережно сохраняли и передали своим коллегам сотрудники лаборатории экспериментальной гистологии ИЭМ. Данные, касающиеся подготовки материала для электронной микроскопии, представлены с учетом многообразного собственного опыта авторов соответствующего раздела и методических разработок сотрудников лаборатории цитологии ИЭМ, организованной профессором А. А. Маниной.

Авторы считают своим долгом поблагодарить всех, кто способствовал выходу в свет этой книги. Особо следует отметить неоценимую помощь лаборанта-исследователя Ларисы Николаевны Шатило при отработке и проверке методов заливки гистологического материала. В работе над отдельными текстами, вошедшими в настоящую книгу, принимал участие к. м. н. А. В. Гиляров. Протокол окраски головного мозга по методу Клювера — Баррера выверен сотрудницей физиологического отдела им. И. П. Павлова ИЭМ М. А. Шкляевой. В разработке метода одновременного селективного выявления эозинофильных гранулоцитов и тучных клеток дыхательных путей принимал участие аспирант Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии П. А. Ворончихин. Рисунки выполнены И. С. Кирик.

Редактор руководства приносит сердечную благодарность своим учителям — доценту Людмиле Ростиславовне Сапожниковой, профессору Георгию Сильвестровичу Катинасу и члену-корреспонденту РАМН Владимиру Александровичу Отеллину.

Авторы надеются, что представленные в книге прописи и протоколы, а также сведения о производителях высококачественных реагентов, материалов и приборов для микроскопии и диагностики помогут всем, кто планирует использовать в своей повседневной работе и научных исследованиях современные методы гистологии, цитологии и электронной микроскопии.

Раздел I

**ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА
ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ**

Глава 1

ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Общие положения

Фиксация — один из ключевых этапов гистологического исследования, от которого во многом зависит качество получаемого препарата. Фиксированный не по правилам или недофиксированный препарат, как правило, непригоден для микроскопического анализа, поэтому необходимо тщательно соблюдать правила фиксации и регулярно контролировать качество реагентов, используемых для приготовления фиксирующих растворов.

Фиксация обеспечивает стабилизацию и уплотнение тканевых структур. Выбор фиксирующей среды зависит от задач исследования. Объем фиксирующей жидкости должен превышать объем кусочков не менее чем в 10 раз. Кусочки в растворе не должны слипаться и скапливаться на дне банки. В большинстве случаев (если нет особых указаний) фиксацию следует проводить при комнатной температуре, поскольку охлаждение раствора ведет к замедлению процесса фиксации, а подогрев — к быстрому развитию аутолиза в центральной части фиксируемого объекта (той области, в которую не успел проникнуть фиксатор).

Важным моментом является правильное иссечение объектов, предназначенных для фиксации и дальнейшего гистологического исследования. Кусочки органов следует вырезать острым ножом или бритвой. Не рекомендуется пользоваться ножницами во избежание травмирования объектов. Нельзя сдавливать кусочки, скоблить или протирать их поверхность, особенно слизистую и серозную оболочки.

Для микроскопического исследования вырезают кусочки органов толщиной 0,5–1,0 см. Длина и ширина могут быть различными (обычно 1,0 × 1,5 см). При этом стараются сформировать объект с таким расчетом, чтобы получаемый срез поместился на стандартное предметное стекло. Ввиду медленного проникновения фиксатора в глубину ткани не рекомендуется брать для исследования более толстые кусочки. Кусочки сразу же помещают в фиксирующую жидкость. Недопустимо обмывание кусочков водой перед фиксацией (это может привести к удалению объектов, имеющих диагностическое значение, и появлению артефактов).

1.2. Фиксация материала для световой микроскопии

Световая микроскопия — микроскопия в проходящем свете видимого спектрального диапазона с использованием способности различных компонентов гистологического препарата к селективному восприятию биологических красителей. Для того чтобы структуры, наблюдаемые в микроскоп, хорошо сохранялись при обработке иссеченного материала, необходимо сделать их устойчивыми к действию применяемых при проводке и окраске химических реагентов. Подобная устойчивость структур, а также уплотнение материала достигаются в ходе фиксации. Фиксация необходима и для максимального сохранения внутриклеточных и тканевых взаимоотношений, только при этом условии можно получить информативные препараты для диагностических и исследовательских целей.

Существуют физические и химические способы фиксации. К первым относятся действие высокой температуры и влияние электромагнитного излучения в сверхвысокочастотном диапазоне (микроволновая фиксация). В настоящее время высокотемпературная фиксация применяется редко. По С. С. Вайлю, кусочки нефиксированной ткани помещают в кипящую воду на 1–3 мин, после чего переносят в 90–100 %-й этанол и после обезвоживания заливают в парафин. Р. Лилли (1969) рекомендует использовать для варки изотонический раствор хлорида натрия (0,85–0,90 %) и изготавливать срезы на замораживающем микротоме без заливки. В этом случае препарат можно получить через несколько минут после доставки срочной биопсии. К возникающим артефактам относят сильное сморщивание тканей и разрушение нежных структурных образований (Вайль С. С., 1934).

Микроволновая фиксация осуществляется при помощи современных лабораторных установок, позволяющих контролировать температуру обрабатываемого объекта. Преимущество этого метода перед другими способами фиксации состоит в мгновенном проникновении фиксирующего фактора во все части объекта. Экспериментальными исследованиями установлено, что оптимальная температура при микроволновой фиксации составляет 45–55 °С. Перегрев объекта до температур выше 65 °С ведет к появлению артефактной вакуолизации цитоплазмы и пикнотизации ядер клеток. Данный метод фиксации рекомендован при проведении срочных биопсий (Bancroft J. D. [et al.], 2002).

Химические методы фиксации основаны на влиянии на тканевые структуры различных химических веществ (спиртов, альдегидов, кетонов, кислот, солей), которые, проникая в фиксируемый

материал, вызывают многообразные физико-химические процессы, приводящие к стабилизации его структуры. Различают простые и сложные (составные) фиксаторы. К первым могут быть отнесены ацетон, этанол, метанол, формалин, тетраоксид осмия. Вторая группа намного более разнообразна и включает сотни различных составных фиксирующих растворов, обладающих различными преимуществами и недостатками.

1.2.1. Ацетон

Ацетон как самостоятельное фиксирующее вещество редко применяется в гистологии из-за сильного сжатия фиксируемого материала. Тем не менее его нередко используют для фиксации цитологических мазков и криостатных срезов, выполненных из нефиксированного материала. Считается, что кратковременная фиксация ацетоном (15 мин) позволяет сохранить часть антигенов, которые разрушаются при других способах фиксации и последующей заливке объектов в парафин. По мнению Б. Ромейса (1954), фиксация чистым ацетоном имеет смысл лишь при необходимости быстрого получения гистологического препарата. Для этого кусочки органов толщиной 1–3 мм помещают на 1–3 ч в безводный ацетон, переносят на 30 мин в ацетон-бензол (1 : 1), затем на 30–60 мин в бензол и заливают в парафин. Непосредственный перенос объектов из ацетона в парафин нежелателен, так как последний почти нерастворим в ацетоне.

1.2.2. Этанол

Для фиксации тканей применяют как чистый этиловый спирт, так и различные смеси этанола и других веществ. В практической работе этанол следует применять при фиксации нервной ткани для окраски по Ниссли и при планировании выявления гликогена. В сравнении с формалиновой спиртовая фиксация дает лучшие результаты и при выявлении железа, бактерий, амилоида. В отличие от формалина спирт обладает меньшей проникающей способностью, поэтому для фиксации берут кусочки не толще 0,5 см.

Фиксирующее действие спирта основано, прежде всего, на удалении воды из тканей — обезвоживании. Этот процесс сопровождается коагуляцией белков без существенного нарушения их антигенной структуры. Согласно Б. Ромейсу (1954), в этаноле полностью сохраняется ряд веществ, которые в других жидкостях растворяются целиком или частично. К таким веществам относятся муцины, гликоген, мочева кислота, железо, кальций. Напротив, жиры и жироподобные вещества, холестеринные соединения

растворяются и экстрагируются. В результате потери воды и липидов цитоплазма сильно сморщивается, причем больше, чем ядро клетки. Несмотря на этот недостаток, фиксация спиртом остается незаменимой для многих специальных исследований.

Обычно этанол промышленного производства, доступный для использования в гистологических целях, соответствует двум категориям:

— *ректификат*, который представляет собой очищенный перегонкой в производственных условиях 95,5%-й этанол (96%-й медицинский спирт);

— *абсолютный спирт*, получаемый в результате ректификации смеси спирта, воды и бензола. Вначале тройной азеотроп указанных компонентов отгоняется до полного удаления воды, затем азеотроп спирта и бензола — до полного удаления бензола.

Получение из 96%-го этанола абсолютного спирта в лабораторных условиях весьма затруднительно, поэтому авторы не рекомендуют использовать описанные в литературе методики с прокаливанием медного купороса (из-за низкого качества получаемого спирта) и способы с применением негашеной извести и металлического кальция (из-за высокой пожароопасности). В настоящее время денатурированный абсолютный этанол поставляется многими ведущими фирмами — производителями химических реагентов для лабораторных исследований, его могут приобрести организации, имеющие соответствующую лицензию.

Перед использованием этанола следует убедиться в том, что содержание в нем воды соответствует допустимому уровню для соответствующих методов фиксации и дальнейшей обработки материала. Содержание воды проверяют ареометром (спиртометром). При этом важно соблюдать рабочую температуру, указанную на спиртометре.

Обычно для фиксации употребляется безводный, так называемый *абсолютный спирт*. Хорошие результаты фиксации удается получить в случае, если толщина объектов не превышает 5 мм. Фиксация идет очень быстро. Для очень тонких кусочков достаточно 15—30 мин, при толщине 1—2 мм — 0,5—1,0 ч, при толщине 3—4 мм — 2—4 ч. Важно, чтобы препараты лежали на толстом слое ваты в большом количестве спирта, а спирт не разбавлялся проникающей из препарата водой, которая при соблюдении указанных условий будет опускаться на дно. Слой ваты создает условия для равномерной фиксации, благодаря которым спирт проникает в препарат со всех сторон.

Действию абсолютного спирта препарат подвергают в течение времени, необходимого для его полного пропитывания. Длительное воздействие абсолютного этанола чрезмерно уплотняет

ткани и делает их хрупкими. Плохо пропитываемые объекты (особенно ткани беспозвоночных) Б. Ромейс (1954) рекомендует фиксировать в кипящем абсолютном спирте (2–10 мин).

Сразу же после окончания фиксации зафиксированные кусочки лучше пропитать и залить (в парафин, целлоидин либо другие среды). Если нет возможности сразу залить фиксированный препарат, то он переносится в терпинеол или 80 %-й этанол, в которых материал может длительно сохраняться без нарушения способности к окраске и резке (Ромейс Б., 1954).

Артефактами спиртовой фиксации являются сильное сморщивание клеток и смещение клеточного и ядерного содержимого, а иногда и самих ядер к середине кусочка (по направлению проникновения фиксатора в объект).

1.2.3. Сложные фиксирующие жидкости, содержащие этанол

Сочетание этанола с другими фиксирующими веществами часто используется в научных исследованиях, поскольку позволяет в значительной мере уменьшить отрицательные свойства индивидуальных фиксирующих агентов и ускорить процесс фиксации и последующей проводки, так как в спиртовых растворах одновременно с процессом фиксации начинается обезвоживание тканей.

Сочетание этанола с формальдегидом. Существует несколько вариантов прописи фиксатора, состоящего из этанола и формалина (или параформальдегида). Чаще всего используют 5–10 %-й раствор формалина на основе спирта различной крепости (от 70 %-го до абсолютного). Для иммуноцитохимических исследований рекомендуется использовать 1–2 %-й раствор формалина (или 0,5–0,7 %-й раствор параформальдегида) на 80 %-м этаноле.

Для приготовления 100 мл фиксатора берут 98 мл 80 %-го этанола и 2 мл концентрированного формальдегида. Если используется сухой параформальдегид, фиксатор удобнее готовить следующим образом. Заранее готовится 4,0 %-й водный раствор параформальдегида, который может длительно сохраняться. Для этого параформальдегид растворяют в дистиллированной воде при нагревании (проще всего закрытую емкость оставить в термостате при 37 или 56 °С на 1–3 сут, несколько раз перемешивая раствор в течение дня). На каждые 80 мл 96 %-го этанола добавляют по 15 мл полученного водного раствора параформальдегида.

Продолжительность фиксации для иммуноцитохимии – 18–24 ч, для обычных окрасок – до 48 ч при комнатной температуре. После фиксации материал в воде не промывают. Обезвоживание

можно начинать с 90—96 %-го спирта (Коржевский Д. Э. [и др.], 2010).

Абсолютный спирт с добавлением ледяной уксусной кислоты (например, 20 мл кислоты на 100 мл спирта) быстро проникает в ткани, так что в нем могут профикироваться за несколько часов и кусочки несколько более крупные, чем в абсолютном спирте. Способ употребления и результаты сходны с теми, которые характерны при использовании абсолютного спирта. После фиксации материал переносят еще на короткий срок в чистый абсолютный спирт. Затем следует заливка (Ромейс Б., 1954).

Жидкость Карнуа. Эта фиксирующая жидкость хорошо сохраняет структуру ядра клетки и часто применяется при необходимости быстрой фиксации и ускоренной проводки. Фиксатор готовится менее чем за 1 ч до начала фиксации. Фиксатор состоит из абсолютного спирта (можно заменить и 96 %-м), хлороформа и ледяной уксусной кислоты в соотношениях 6 : 3 : 1. При фиксации в жидкости Карнуа следует вырезать кусочки толщиной не более 4 мм. Продолжительность фиксации составляет 3—4 ч. Длительное пребывание объектов в фиксаторе в большинстве случаев нежелательно. После жидкости Карнуа материал обезвоживают в абсолютном этаноле, после чего можно сразу приступить к заливке. В случае необходимости после фиксации и обезвоживания материал можно длительно хранить в метилсалицилате (Коржевский Д. Э. [и др.], 2010).

Спирт-цинковый фиксатор по Рейману и Унна (1912) состоит из 2 % раствора хлористого цинка в 96 %-м этаноле. Этот фиксатор Б. Ромейс рекомендует для лучшего выявления цитоплазмы клеток.

Этанол-уксусная кислота. Смесь 96 %-го этанола с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3:1 в англоязычной литературе иногда называют жидкостью Карнуа I, а обычную жидкость Карнуа — Карнуа II. Условия фиксации материала аналогичны условиям фиксации в жидкости Карнуа.

Спирт-формалин-уксусная кислота (СФУ). Существует несколько вариантов фиксирующих растворов, в которые входят помимо этанола формалин и ледяная уксусная кислота. Все они считаются (Лилли Р., 1969) хорошими фиксаторами для цитоплазматических структур и являются оптимальными для стабилизации гликогена в тканях. Фиксирующие растворы готовятся в день взятия материала, поскольку их качество изменяется с течением времени. СФУ по Лилли состоит из 85 мл 96 %-го этанола, 10 мл концентрированного (35—40 %) формальдегида и 5 мл ледяной уксусной кислоты. Для лучшей стабилизации гликогена рекомендуется фиксировать материал при 0—5 °С в течение 24 ч. После фиксации

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

**Подготовка материала
для гистологического исследования
и электронной микроскопии**

Руководство

Под редакцией Д. Э. Коржевского

Редактор *Капполь О. С.*
Корректор *Терентьева А. Н.*
Верстка *Антоновой Е. А.*

Подписано в печать 30.10.2013. Формат 60 × 88 ¹/₁₆.
Печ. л. 8,0. Тираж 1500 экз. Заказ №

ООО «Издательство „СпецЛит“».
190103, Санкт-Петербург, 10-я Красноармейская ул., 15.
Тел.: (812) 495-38-94, 495-36-12, 495-36-09
<http://speclit.spb.ru>

Отпечатано в типографии «L-PRINT»,
192007, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 201, лит. А, пом. 3Н.

ISBN 978-5-299-00569-1



9 785299 005691