***Этапы приготовления гистологических препаратов***

*Гистологические препараты* подразделяют на временные,предназначенные для однократного изучения и постоянные, которые долго сохраняются и подвергаются многократному исследованию. Гистологический препарат может представлять собой мазок, отпечаток, пленку (тотальный препарат) или тонкий срез органа. Гистологический препарат должен удовлетворять следующим требованиям: 1) должен быть прозрачным; 2) структуры должны быть контрастны (отличаться одна от другой показателем преломления); 3) неизменяемости при длительном хранении (для постоянных препаратов).

***Основные этапы приготовления гистологического препарата:***

1. взятие и фиксация материала; 2. уплотнение; 3. получение срезов; 4. окрашивание; 5. заключение в консервирующую среду.

Взятие и фиксация гистологического объекта. При взятии ткани или органа пользуются очень острым инструментом (скальпелем, бритвенным лезвием, малыми глазными ножницами). Объекты, подлежащие исследованию, должны быть свежими, необходимо избегать их сдавливания. Кусочки должны быть мелкими, желательно не более 1х1 см или 0,5х0,5 см.

Фиксация материала – очень важный этап в гистологической технике.

Цель фиксации – сохранение тканевых структур, остановка процессов жизнедеятельности и предохранение от дальнейших разрушений. В процессе фиксации в тканях происходят сложные физико-химические изменения, наиболее важным из которых является процесс денатурации белков. При этом необходимо по возможности стремиться сохранить прижизненную структуру изучаемой системы, не вызвав в ней образования структур, не свойственных ей в норме, – артефактов.

Все фиксирующие средства делятся на простые и сложные. К простым фиксаторам относят: формалин (обычно 10-12%-й раствор), метиловый спирт, тетраоксид осмия (1-2%-й раствор) и др. Сложные фиксаторы состоят из нескольких компонентов. Например, в состав смеси Буэна входят формалин, спирт, пикриновая кислота; в состав жидкости Карнуа – этиловый спирт (абсолютный или 96-градусный), хлороформ, ледяная уксусная кислота.

Продолжительность фиксации зависит от свойств фиксатора, размеров и плотности объекта и обычно колеблется от 2 до 24 ч.

***Требования, предъявляемые к фиксатору:***

- легкое и быстрое проникновение в ткани;

- равномерное воздействие фиксатора на все компоненты ткани;

- фиксатор не должен препятствовать последующей обработке тканей (например, окрашиванию);

- объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 20-30 раз.

Фиксирующую смесь необходимо готовить перед фиксацией и использовать только один раз. Перед погружением в фиксирующую жидкость объект нельзя отмывать водой. В случае необходимости очистить материал от слизи или других загрязнений его следует поместить в физраствор. После большинства способов фиксаций объект промывают водой для удаления фиксатора. В результате воздействия фиксатора исследуемый образец, как правило, несколь-ко уменьшается в объеме и уплотняется, однако этого недостаточно для изготовления из материала тонких срезов.

*Уплотнение.* Целью этого этапа изготовления гистологическогопрепарата является придание исследуемому материалу такой плотности, которая позволит получить срезы необходимой толщины. Этого достигают двумя способами: замораживанием образца с последующей резкой на замораживающем микротоме или криостате или пропитыванием уплотняющими средами (парафин, целлоидин и др.).

Для заключения в парафин или целлоидин фиксированные образцы подвергают обезвоживанию, так как большинство фиксаторов является водными растворами, и вода не смешивается с уплотняющими средами. Дегидратацию осуществляют проведением материала через спирты возрастающей концентрации: 60, 70, 80, 90 и абсолютного – 100%

*Заливка в парафин.* Парафин при комнатной температуре находится в твердом состоянии, поэтому перед пропитыванием его подогревают в термостате до 52-56°С. Так как парафин не смешивается со спиртами, используют промежуточные среды (ксилол, бутанол, толуол и др.) и растворяют парафин, обеспечивая постепенное пропитывание образца заливочной средой. После дегидратации образца в спиртах его переносят в смесь из равных частей ксилола (или другой промежуточной средой) и абсолютного спирта, а затем чистый ксилол (первый и второй). Далее материал погружают на несколько часов в смесь парафина и ксилола (при температуре 37°С), затем на 1-2 ч в чистый сменяемый два раза расплавленный парафин (при температуре 54-56°С). Затем чистый парафин наливают либо в часовое стекло либо в формы (бумажные или металлические). Из затвердевшего парафина с заключенным в него образцом вырезают прямоугольный блок, который закрепляют расплавленным парафином на деревянном кубике. В таком виде материал готов для резки и получения тонких (4-6 мкм) серийных срезов в виде лент. Следует учитывать, что при парафинировании происходит большее сжатие кусочка, чем при заливке в целлоидин.

*Заливка в целлоидин.* Целлоидин–специальным образом приготовленная целлюлоза. После дегидратации образец из абсолютного спирта переносят в смесь из равных частей абсолютного спирта и безводного эфира, а затем в 2, 4 и 8%-ные растворы целлоидина на несколько суток в каждый. Далее материал переносят в густой целлоидин, который уплотняют в парах хлороформа. Из затвердевшего целлоидина вырезают блоки, наклеивают на деревянные кубики и для хранения помещают в 70%-ный спирт. Отрицательными сторонами этой заливки является длительность уплотнения (10-15 суток), невозможность получения срезов тоньше 7-8 мкм, сложность получения серийных срезов.

*Изготовление срезов.* Для получения срезов используют специальные приборы – микротомы. Для получения срезов с парафиновых и целлоидиновых блоков используют санные и ротационные микротомы, для получения замороженных срезов используют замораживающий микротом и криостат. Наиболее распространенным типом микротомов при гистологических исследованиях являются санные (рис. 2)*.*



**Рис. 2.** Санный микротом с подъемным объектодержателем по наклонной плоскости.

*1* –станина; *2 –* ножевые салазки с ножом; *3 –* микрометрический винт;
*4 –* рамка с ограничителем; 5 –объективные салазки с объектодержателем

Основные части санного микротома: станина (или корпус), микрометрический винт, объектодержатель с основанием (объектные салазки), ползун (ножевые салазки) с зажимом для ножа.

*Станина* –массивная вертикальная металлическая пластина,укрепленная на столь же массивном основании (рис. 2 – 1). В верхней части станины имеются две или три хорошо шлифованные поверхности (в некоторых конструкциях это особые привинченные пластины), по которым двигаются ножевые салазки (рис. 2 – 2). С обеих сторон имеются приспособления, ограничивающие движения ножевых салазок (рис. 2 – 4). На боковой поверхности также укреплены шлифованные пластины, по которым двигаются объектные салазки (рис. 2 – 5).

*Микрометрические винты* (рис. 2 – 3)в различных микротомахнеодинаковы: в одних микротомах они представляют собой вывинчивающийся металлический стержень, который поднимает объектные салазки, в других винт не вывинчивается, а толкает объектодержатель. Микрометрический винт двигается или по наклонной плоскости, или по вертикали. Винт в этом микротоме выдвигается и подает вперед металлический стержень объектодержателя. Специальной разжимной гайкой он связан с рамкой, на которой укреплен ограничитель. Внутри рамки стержень связан с зубчатым колесом, поворачивающимся при помощи специального приспособления на определенное число зубьев. На этом приспособлении имеется 15 делений, каждое из которых соответствует движению зубчатого колеса на один зубец и подаче объектодержателя на 1 мкм.

Устанавливая на шкале определенное количество делений, можно регулировать толщину срезов. Микрометрический винт укреплен

* станине микротома с помощью зажима, который находится на ее противоположной стороне. Когда винт использован, зажим отпускают, поворачивают рамку на 180° и вывинчивают винт обратным ходом.

*Объектодержатель* –зажим для блоков,располагается на основании, которое иначе называют объектными салазками, основания объектодержателя и самого объектодержателя. Салазки двигаются по наклонным боковым шлифованным поверхностям станины. В салазках при помощи винта укреплен металлический стержень, свободный в задней части и соприкасающийся в передней части с микрометрическим винтом. Основание объектодержателя укреплено на салазках в передней их части и представляет собой металлическую пластину, в центральной части которой имеется канал для штифта объектодержателя. Объектодержатель укреплен в канале с помощью винта. Опуская этот винт, можно с помощью кремальеры поднимать и опускать объектодержатель. Сам объектодержатель представляет собой зажим для блоков. Наиболее распространен рамочный зажим, в котором во внутренней рамке укрепляют блок. Кроме того, имеется еще наружная рамка. Рамки могут совершать качательные движения по переднезадней и поперечной оси.

*Ползун* (ножевые салазки) –массивная скользящая деталь,которая несет на себе зажим для ножа. При помощи этого зажима нож укрепляется, и ему придается нужный наклон.

На санных микротомах можно получить достаточно тонкие срезы толщиной 4-7 мкм. Для быстрого получения срезов используют замораживающий микротом, но их недостаток – невозможность получить тонкие срезы.