

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»



МЕТОДИКА

**ФИКСАЦИИ, ПРОВОДКИ, ПРИГОТОВЛЕНИЯ СРЕЗОВ ПРИ
ПРОВЕДЕНИИ СУДЕБНО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

(шифр специальности – 24.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика фиксации, проводки, приготовления срезов при проведении судебно-гистологических исследований
2. Шифр специальности методики	24.1(1)
3. Информация о разработчике методики	Оспанова К.Е. - судебно-медицинский эксперт-гистолог
4. Сущность методики	Процесс изготовление гистологического материала для исследования: фиксация, обезвоживание, заливка, микротомирование, окрашивание срезов, изготовление стеклопрепаратов
4.1. Объекты исследования	Аутопсийный материал (фрагменты внутренних органов и частей трупа, забор которых производится во время вскрытия)
4.2. Методы исследования	Гистологический
4.3. Краткое поэтапное описание методики	<p>Затем залитую ткань остужают до затвердевания блока. Микротомирование - представляет собой изготовление тонких срезов на специальном приборе - микротоме. Толщина срезов, предназначенных для световой микроскопии, не должна превышать 4-5 мкм, для электронной — 50-60 нм.</p> <p>Окрашивание срезов - позволяет выявить структуру ткани за счет неодинакового химического сродства различных элементов ткани к гистологическим красителям. Перед окрашиванием выполняется монтирование среза на предметное стекло. Для избежания формирования складок срезов после микротомирования помещают на поверхность подогретой воды, где он расправляется, а потом уже на стекло. Окрашивание, как и все остальные стадии процесса изготовления гистологического препарата, может выполняться вручную и автоматически. Различают традиционное окрашивание и иммуногистохимическое.</p> <p>Изготовление стеклопрепарата - представляет собой помещение окрашенного среза, монтированного на предметном стекле, под покровное стекло с использованием среды для заключения, имеющей коэффициент</p>

	преломления, близкий к таковому у стекла - канадский бальзам, полистирол, специальные среды для заключения
5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК	Протокол №2 от 6-7 июня 2019г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Имамбаева Н.Е. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории

Содержание:

1. Общие положения	6
2. Перечень использованных источников	25

Методика фиксации, проводки, приготовления срезов при проведении судебно-гистологических исследований

После забора материала выполняется его подготовка к исследованию, включающая в себя ряд этапов.

Фиксация

(от лат. *fixatio* - закрепление)- фрагмент ткани обрабатывают с помощью жидкости-фиксатора, в роли которого чаще всего выступает формалин, реже-спирты, пикриновая кислота и др. Такая обработка предотвращает распад клеток и разрушение структуры ткани под действием собственных ферментов клеток и процессов гниения, таким образом, сохраняя прижизненную структуру и делая возможным изучение ткани. Принцип действия фиксирующих жидкостей основан на быстрой гибели клеток и коагуляции белка.

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение, прекращает аутолиз, стабилизирует локализацию структур. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов. Для достижения этой цели возможны 3 подхода:

1. высушивание;
2. замораживание;
3. химическая фиксация:

- альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид)
- хромовая кислота
- тетраоксид осмия
- спирты (этанол, метанол)
- ацетон
- соли ртути (сулема)
- кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая» азотная)

Мы рассмотрим третий вариант.

Фиксация всегда приводит к большим или меньшим изменениям структуры и объема ткани, степень выраженности которых зависит от pH фиксатора, его концентрации, температуры, продолжительности воздействия и других факторов. Концентрация ионов водорода фиксатора должна соответствовать таковой в тканях, поэтому фиксатор должен иметь pH, близкий к нейтральному. Увеличение температуры фиксатора ускоряет процесс, но вызывает еще большие изменения в тканях. Слишком продолжительная фиксация приводит к значительному уплотнению материала, что в дальнейшем затрудняет его обработку. Для каждого конкретного вида исследования подбирают наиболее приемлемый фиксатор.

Полноценная фиксация материала обеспечивается при соблюдении ряда требований.

После вырезки кусочка ткани его немедленно погружают в фиксатор. Объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 10-20 раз, так как тканевая жидкость может существенно

изменить концентрацию фиксатора. При большом числе кусочков их помещают в несколько банок. Не допускается слипание кусочков в растворе и их прилегание к дну ёмкости. Для этих целей на дно её кладут слой марли. Во избежание подсыхания всплывших кусочков (например, легкого) сверху их покрывают слоем марли. Фиксация в формалине проводится при комнатной температуре 1-2 дня. Через сутки раствор меняют. Более длительная фиксация нежелательна.

Для подробного микроскопического исследования центральной и периферической нервной системы материал помещается в следующие фиксирующие жидкости; нейтральный 10-12 процентный формалин; 96 градусный этиловый спирт; жидкости Орта и Ценкера, Фиксирующие жидкости сменяют через сутки с момента взятия материала. Спирт меняется ежедневно в течение 5 суток.

Ткани высохшие - мумифицированные, находящиеся в состоянии торфяного дубления, а также высохший жировоск, направляют в лабораторию в сухом виде, не фиксируя ни в какой жидкости, в хорошо закупоренной стеклянной посуде. Жировоск внутри нее обкладывают слоем марли. В лаборатории ткани, жировоск размачивается в 3 процентном формалине на физиологическом растворе в течение 2-3 суток, а затем обрабатывается обычным способом. Если жировоск находится во влажном состоянии, кусочки его берут в самом начале исследования трупа, немедленно помещая в 10 процентный раствор формалина.

В том случае, если цвет фиксатора изменяется после погружения в него кусочков ткани, фиксатор необходимо немедленно сменить.

Недопустимо повторное использование фиксаторов.

Для каждого фиксатора следует соблюдать установленное время фиксации. Длительное пребывание материала возможно лишь в некоторых фиксаторах, например 10 % нейтральном формалине, жидкости Боуэна.

Для фиксации лучше использовать ёмкости с широким горлом, чтобы не возникло проблем с извлечением фиксированного материала. Равномерность фиксации некоторых рыхлых тканей, например легочной, достигается помещением их на дно банки, а поверх них - прокладки из слоя марли или ваты. Чаще материал фиксируют при комнатной температуре, но для некоторых видов исследования (гистохимических, электронно-микроскопических и др.) необходимо проводить фиксацию при 4°C. Материал срочных биопсий фиксируют при повышенной температуре фиксатора. В экспериментальных исследованиях применяют также прижизненный перфузационный метод фиксации и его сочетание с обычным погружением в фиксирующую жидкость.

ПРОСТЫЕ ФИКСИРУЮЩИЕ ЖИДКОСТИ

Химическая фиксация:

1. альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид);
2. хромовая кислота;
3. тетраоксид осмия;
4. спирты (этанол, метанол);

5. ацетон;
6. соли ртути (суллема);
7. кислоты (уксусная, трихлоруксусная, **никриновая**, азотная).

Альдегиды

Можно хранить месяцами, надо всего лишь контролировать pH.

Формалин

Основным, широко применяемым фиксатором служит формалин, приставляющий собой 40% раствор формальдегида. Формальдегид - это газ, растворимый в воде до концентрации 40% по массе, каким он и поступает в продажу под названием «Формалин». В гистологической практике используют 10% раствор формалина, что соответствует 4% формальдегиду.

Из формальдегида готовят нейтральный (забуференный до pH 7,0) 10-12% формалин. Для этого в банку с 40% формалином засыпают карбонат кальция или магния либо смесь этих солей - доломит из расчета 100 г на 1 л формалина. Для получения 10% нейтрального формалина через 24 ч к 1 части 40% нейтрального формалина добавляют 9 частей водопроводной воды. Продолжительность фиксации - 24-48 ч при 20°C.

В водных незабуференных растворах формальдегид со временем превращается в муравьиную кислоту, метиловый спирт и ацетон, которые ухудшают качество фиксации, как и выпадение белого осадка параформальдегида. В результате точную концентрацию формальдегида в растворах формалина установить не представляется возможным. Если на дне банки с 40% формалином образовался осадок белого цвета (параформальдегид), то его можно растворить, подогрев до 70-80° С (в вытяжном шкафу!), и использовать для фиксации. Очищенный коммерческий параформальдегид применяют как составную часть многих фиксаторов для гистохимических и электронно-микроскопических исследований.

Фиксатор может показывать себя не с лучшей стороны из-за примесей, в основном метанола (до 16%). Для этого существуют методы приготовления фиксаторов, свободных от метанола

4% ф-д по Гайеру

1. 2гр параформальдегида;
2. 50мл 0,1М фосфатного буфера (pH 7,4-7,6) нагревают до 70° до просветления раствора, помешивают, охлаждают и фильтруют. Его pH 7,3-7,5.

40% ф-д по Глаурт

1. готовят 40% параформальдегид (40гр порошка формальдегида;
2. 100мл дистиллированной воды при нагревании до 65°C, перемешивая;
3. несколько капель 40% гидроксида натрия до просветления раствора.

Солевой формол

1. Нейтральный 40% формалин 100 мл;
2. хлорид натрия - 8,5 г;

3. водопроводная вода - 900 мл

Продолжительность фиксации 48 ч при 20°C с последующей промывкой в проточной воде в течение 6-12 ч.

Универсальным фиксатором, пригодным для гистологических и большинства гистохимических исследований, является нейтральный формалин (по Лилли).

1. 100 мл 40 % формалина + 900 мл дистиллированной воды;

2. 4 г дигидроортофосфата натрия моногидрата (однозамещенного фосфата натрия);

3. 6,5 г гидроортофосфата натрия (двузамещенного фосфата натрия).

Фиксатор Лилли для кислых гликозаминогликанов

1. Нитрат свинца - 8гр;

2. 40% раствор формальдегида - 10мл;

3. вода-10мл;

4. этанол - 80мл;

продолжительность фиксации 24 часа при комнатной температуре (при 4С - 2-3дня, 10-14 дней при 25°C).

Фиксатор Жандра для гликогена

1. Пикриновая кислота, насыщенная в 96% спирте- 85 частей;

2. раствор формальдегида 40% - 10 частей;

3. ледяная уксусная кислота - 5 частей

Глутаровый альдегид для ферментов

Обеспечивает наибольшую сохранность ферментов.

1. 0,2М фосфатный или какодилатный буфер (рН 7,2-7,4) - 50мл;

2. дистиллированная вода - 40мл;

3. 25% глутаровый альдегид - 10мл;

4. сахароза - 8,5г.

Раствор Флеминга

1. 2% тетраоксид осмия на дистиллированной воде - 2мл;

2. 1 % раствор хромовой кислоты - 7,5мл;

3. ледяная уксусная кислота - 0,5мл (смешивать перед использованием).

Хромовая кислота.

Для стабилизации липидов, для фиксации гликогена и нуклеиновых кислот. **Фиксатор Элфтмана (бихроматсулема)**

1. Сулема - 5 г;

2. бихромат калия - 2,5 г;

3. дистиллированная вода -100мл;

Продолжительность фиксации 3 дня,

Этиловый спирт (80%, 90%, 96% и 100%)

Его применяют для осаждения белков, в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку. Продолжительность фиксации от 2ч до 1 суток. Увеличение длительности

фиксации, особенно в 100% спирте, нежелательно, так как материал значительно уплотняется и происходит его пересушивание. Оптимальная температура для фиксации материала в спирте +4°C, но ее можно проводить и при комнатной температуре. Если после спиртовой фиксации предстоит резать ткань на замораживающем микротоме или криостате, то кусочки промывают в течение 1-2 ч до их полного погружения на дно банки. при этом происходит насыщение ткани водой.

Уранилацетат

Используют в электронной микроскопии как третий фиксатор (после альдегида и тетраоксида осмия) и одновременно как контрастер. Хорошо выявляет мембранные структуры благодаря стабилизации фосфолипидов, стабилизации ДНК. Применяют 0,25*2% раствор в воде или в 50-70% спирте (окрашивание 8 минут).

Ацетон

Его действие подобно действию спирта. Ацетон используют для увеличения скорости фиксации. Применяют 100% ацетон, для получения которого в коммерческий ацетон засыпают прокаленный сульфат меди (медный купорос) или силикагель. В ацетоне фиксируют кусочки толщиной 3-4 мм в течение 2 ч при 20°C или 30 мин - 1 ч в термостате при 60°C в плотно закрытой посуде. Ацетон значительно уплотняет ткань и при увеличении продолжительности фиксации возможно сморщивание объектов. Чаще ацетон применяют для обработки материала срочных биопсий при его заливке в парафин.

Кислоты

Азотная, пикриновая, уксусная, трихлоруксусная. Быстро проникают в ткани, препятствуют их сморщиванию, ослабляют состояние гидратации. Входят в состав декальцинирующих смесей.

Фиксатор Жандра для гликогена

1. Пикриновая кислота, насыщенная в 96% спирте - 85 частей;
2. раствор формальдегида 40% - 10 частей;
3. ледяная уксусная кислота - 5 частей

Жидкость Буэна

Классический фиксатор для экспериментальных исследований.

1. Насыщенный раствор пикриновой кислоты - 75 мл;
2. нейтральный 40% формалин - 25 мл;
3. ледяная уксусная кислота - 5 мл

Продолжительность фиксации 1-24 ч при 20°C. Насыщенный раствор пикриновой кислоты готовят заранее из расчета 3 г кристаллической пикриновой кислоты на 1 л горячей дистиллированной воды. После фиксации кусочки отмывают от избытка пикриновой кислоты в 70 % спирте, затем заливают в парафин.

Жидкость Карнуа

Универсальный фиксатор для большинства гистологических и гистохимических исследований (кроме выявления липидов). Наилучший для кожи, для предупреждения пересушивания в качестве промежуточной среды используют хлороформ.

1. Спирт 100 % или 96 % - 60 мл;
2. хлороформ - 30 мл;
3. ледяная уксусная кислота - 10 мл

Продолжительность фиксации 2-4 ч при 4°C или 1-2 при 20°C. Затем материал помещают в 100 % спирт. Если материал не сразу подлежит проводке, то его можно перенести 96 % спирт и держать в нем до 3 суток.

Сюда также входят фиксирующие смеси по Боену, Жандру, Карнуа, Лилли, Ценкеру, Бродскому, прочее.

Сулема (дихлорид ртути)

Сулему применяют в качестве фиксатора с начала развития гистологии. Готовят насыщенный раствор: Юг сулемы на 100 мл дистиллированной воды или изотонического раствора хлорида натрия доводят до кипения, охлаждают, фильтруют. Продолжительность фиксации кусочков толщиной 3мм 6-12 ч при 20°C. При фиксации сулемой возможно появление в тканях кристаллического осадка, который удаляют путем обработки срезов йодированным 70% спиртом (на 50 мл 70% спирта — 5-10 капель 5% спиртового раствора йода до появления оранжевого цвета). По мере обесцвечивания йодированного спирта со срезами его заменяют свежей порцией вплоть до полной потери цвета затем срезы промывают в 3-4 сменах 70% спирта.

СЛОЖНЫЕ ФИКСАТОРЫ

Составными частями сложных фиксаторов являются простые. Существует множество вариантов фиксирующих смесей. Ниже приведены наиболее распространенные,

Спирт-формол по Шаферу

10% нейтральный формалин, который готовят из 1 части нейтрального 40% формалина и 2-3 частей 96% спирта.

Продолжительность фиксации 24-48ч. Дальнейшая промывка в воде не требуется, и материал сразу же помещают в 96 % спирт.

Кальцин-формол по Бейкеру

Используют для фиксации липидов.

1. 10 мл 40% формалина;
2. 90 мл дистиллированной воды;
3. 1 г хлорида кальция.

Растворы смешивают. Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20°C.

Фиксатор Бейкера приготовленный из параформальдегида

С успехом применяют для гистохимических исследований

1. 50 г параформальдегида;
2. 500 мл дистиллированной воды;
3. добавляют с одновременным встряхиванием несколько капель 1% гидроксида натрия до исчезновения осадка;
4. 10 г хлорида кальция;
5. 500 мл дистиллированной воды.

Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20°C,

Используется также **фиксатор Карнуа**, в состав которого входят

1. 75 мл 100 % спирта;
2. 25 мл ледяной уксусной кислоты;

Условия фиксации те же.

В случае отсутствия этилового спирта вместо жидкости Карнуда можно использовать смесь следующего состава;

1. Изопропиловый спирт-60мл;
2. пропионовая кислота-30м;
3. ацетон - 10мл;
4. диоксан - 10мл;

Продолжительность фиксации 12-24ч при 20°C; для промывки и обезвоживания применяют изопропиловый спирт.

Жидкость Цецкера - сулемовая смесь.

1. Бихромат калия 2,5г;
2. сульфат натрия 1 г;
3. дистиллированная вода 100мл (это-жидкость Мюллера);
4. сулема 5г;
5. ледяная уксусная кислота 5мл.

Ледяную уксусную кислоту можно заменить нейтральным 10% формалином (фиксатор Максимова, ценкер-формол). Продолжительность фиксации 1-24 ч при 20°C. После фиксации материал в течение 12-24 ч отмывают в проточной воде и помещают в йодированный 70% спирт для удаления остатков сулемы. При добавлении 10 мл 2 % раствора тетраоксида осмия хорошо фиксируются и окрашиваются липиды.

В последнее время для гистологических исследований часто применяют глугаровый альдегид, параформальдегид, фиксаторы Ито, Замбони и др., особенно в тех случаях, когда материал предназначается одновременно для нескольких видов исследования (иммуноморфологического, электронно-микроскопического), а его количество ограничено, например, при функциональных биопсиях.

Обезвоживание (проводка)

- процесс дегидратации (обезвоживания) фрагмента ткани и пропитки его парафином. Этот этап обеспечивает уплотнение ткани, которое, в свою очередь, необходимо для получения срезов (если ткань будет излишне мягкой, то при микротомировании она будет «сминаться», образуя складки, разрывы и другие артефакты, делающие ее непригодной к изучению).

Перед заливкой материала в парафин или целлоидин его необходимо обезводить. Существует несколько традиционных способов обезвоживания. Самым распространенным является обезвоживание в спиртах восходящей концентрации, начиная с 70 %. Обычно применяют батарею спиртов, состоящую из двух порций 96 % и двух - 100 % спирта. Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах в среднем 48 ч в зависимости от качества материала (содержания жира в ткани) и размера кусочков, а также от их количества. При использовании автомата для заливки количество спиртов увеличивают, а при проведении кусочков по спиртовой батарее вручную их

осторожно промокают фильтровальной бумагой или салфеткой из марли, что позволяет реже менять спирты в батарее. Процесс обезвоживания можно ускорить, периодически встряхивая кусочки в банках со спиртами или поместив их в термостат при 37°C. Спирты в батарее необходимо своевременно заменять. Контролировать пригодность спирта позволяет проба с водой. В отлитое из банки небольшое количество спирта добавляют 1 каплю воды. Помутнение раствора свидетельствует о необходимости замены спирта в батарее.

Абсолютный спирт можно приготовить из 96 %. Для этого применяют сульфат меди, который помещают в ступку и прокаливают на спиртовке или в термостате, периодически растирая и размешивая до консистенции пыли и бледно-голубого цвета. Затем сульфат меди (1 часть) засыпают в банку с 96 % спиртом (4 или 6 частей), плотно закрывают ее крышкой, взбалтывают и оставляют на несколько дней, периодически встряхивая. Сульфат меди адсорбирует воду из спирта и вновь приобретает синюю окраску. Перед использованием абсолютного спирта проводят его контроль спиртометром или в пробирку с небольшим количеством ксилола (4-5 мл) добавляют каплю приготовленного спирта (раствор мутнеет, если спирт недостаточно обезвожен). Хорошим адсорбентом воды из спирта является также силикагель после предварительного просушивания его в термостате.

При отсутствии 100% спирта в батарею включают еще одну порцию 96% спирта. Однако в этом случае всегда есть опасность недостаточного обезвоживания и возникновения трудностей при получении срезов.

С целью ускорения обезвоживания применяют ацетон без примесей (ЧДА), предварительно добавив в него силикагель для удаления остатков воды или дистиллированный ацетон. Обезвоживание проводят в 2-3 сменах ацетона от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины объектов. Обезвоживание тканей возможно с помощью 99% изопропилового

спирта, который непосредственно смешивается с парафином без промежуточных растворителей (ксилол, хлороформ и др.). Таким же свойством обладает диоксан, однако в связи с высокой токсичностью он не нашел широкого применения в патогистологической технике.

Для обезвоживания глицерином [Беккер Г.М., 1958; Wolf J., 1939, и др.] кусочки ткани последовательно помещают в 60%, 80% и 100% глицерин на 3-4 ч, а затем в смесь, состоящую из равных частей 100% глицерина и ксилола.

Выраженное влияние на скорость обезвоживания оказывает микроволновое излучение. Объекты в 70 % спирте помещают на 20 с в микроволновую печь (2,5 Гц/500 В), а затем до обезвоживают в абсолютном спирте в течение 30-60 мин.

Секционный и биопсионный материал часто обезвоживают в аппаратах типа АТ-5 и др. с последующим пропитыванием толуолом, хлороформом или их смесью с парафином. При этом применяют две порции 96 % спирта и две - 100 %, Общая продолжительность обезвоживания 48 ч. Преимущество использования аппаратов состоит в том, что в них материал

постоянно перемешивается и находится во взвешенном состоянии. Однако аппарат не включается автоматически после внезапного перепада напряжения в электрической сети, что может привести к просушиванию большого количества материала.

ПРОВОДКА В ИЗОПГАНОЛОВОМ СПИРТЕ

Станция	Реагент	Экспозиция
1	50%-ный водный раствор изопропилового спирта	1 час.
2	Абсолютизованный из о пропанол	30 мин.
3	Абсолютизованный изопропанол	30 мин.
4	Абсолютизованный изопропанол	30 мин.
5	Абсолютизованный из о пропанол	1 час.
6	Абсолютизованный и:юиронанил	1 час.
7	Абсолютизованный изопропанол	2 час.
8	Абсолютизованный из о пропанол	3 час.
9	Абсолютизованный из о пропанол	3 час.
10	Парафин	1 час.
11	Парафин	3 час.
12	Парафин	4 час.
Итого		20 час. 30 мин.

Примечание: использовать только абсолютированный 99,7° и выше изопропанол. Также хорош (даже несколько лучше) химически чистый изопропанол (ХЧ). Другие не годятся, снижение градусности катастрофически снижает качество препаратов. Никаких добавок к спирту не применять.

Данный вариант проводки позволяет провести в течение суток в 1 -ной корзине до 400 кусочков органов (секционный материал - т.е. крупных по площади, но толщиной до 3 мм). Вакуумник включать не требуется. В этом варианте проводки легко применима (при необходимости) двойная загрузка, но это увеличивает время, т.к. в парафинах материал должен находиться не менее 8 часов, причем не менее 3,5 часов в чистых, следовательно на каждой станции - по 3,5 часа. Т.о. вся проводка - почти 2 дня. Биопсии проходят быстрее.

Увеличение времени пребывания в спиртах свыше указанного не улучшает и не ухудшает качества препаратов. Критично время пребывания в парафине - его уменьшение существенно ухудшает пропитывание кусочков и средина вываливается. Это время при возможности можно увеличивать.

При замене спиртов - на 1 шаг назад. Одновременно заменяется 50% изопропанол (смесь с водой готовится из чистого спирта). Менять - по мере загрязнения. Но после проводки более 300 кусочков - обязательно.

Данная проводка по качеству выше ксилольной и ацетоновой, почти аналогичная хлороформенной, но имеется существенная экономия на

реагентах, так как исключается промежуточная среда.

Заливка

Для получения тонких (до 6 мкм) гистологических срезов необходимо фиксированный и промытый материал залить в плотную среду, предварительно пропитав ею кусочки тканей. В зависимости от способа растворения все заливочные среды разделяют на растворимые в органических растворителях и водорастворимые. К первым относятся парафин, пластические полимеры на основе парафина, целлоидин, ко вторым - желатин, поли этиленгликоли, полиэфиры, некоторые метакрилаты и т.д.

Заливка ткани в парафин

Парафин — смесь высокомолекулярных предельных углеводородов, продукт перегонки нефти; растворяется в анилине, бензоле, бергамотном масле, хлороформе, декалине, диоксане, бутаноле, пропаноле, толуоле, трихлорэтилене, ксилоле. Каждый из этих растворителей можно использовать в качестве промежуточной среды между спиртом и парафином. Температура плавления различных парафинов от 27 до 62°C. В гистологической технике применяют парафин с температурой плавления 56°C.

Важнейшим условием успешной заливки материала является своевременная смена реагентов в процессе их загрязнения, а также соблюдение рекомендуемых временных и температурных параметров. Кроме того, нужно стремиться к тому, чтобы одновременно заливать одинаковые по толщине и плотности кусочки ткани.

	Схема Меркулова	Схема Волковой—Елецкого
Фиксация	1. формалин 10 % 24 ч 2. спирт-формол 24 ч 3. жидкость Карпса 2 - 4 ч 4. спирт 96-100% 2-24 ч 5. промывание в проточной воде 12-24 ч	
Обезвоживание	1. спирт 96 % (24 ч) 2. спирт 96 % 1(24ч) 3. спирт 100% 1(24ч)	спирт 50% 2 - 4 ч спирт 60 % 2 - 4ч спирт 70% 12 - 24ч
	4. спирт 100 % 1 (2ч)	спирт 96 % 1 12 ч спирт 96 % 1 12 ч спирт 100 % 1 1-12 ч спирт 100 % 11 12 ч спирт 100 % + хлороформ (1:1) -2-3ч

Заливка в парафин	1.спирт+хлороформ (1:1) - 6-12ч, или спирт+ксилол (!: 1) - 1 -3 ч, или хлороформ -6-12ч. или ксилол - 1-6ч 2.хлороформ+парафин (1:1 — «каша») 37°C 2-3ч, или ксилол+ларафин (1:1 «каша»)37aC 1-2ч 3.парафин 1 56°C-2ч 4.парафин' 11 56°C-1 ч	1.хлороформ 1-1,5ч 2.хлороформ П-0,5ч 3.хлороформ III-0,5 ч 4.хлороформ+парафин (1:1) 37°C-3-6ч 5.хлороформ+парафин (1:1) 56°C 0,5-1ч 6.парафин 1 56°C-2ч 7.парафин 1] 56°C-2ч 8.парафин11 56°C-1ч
-------------------	---	---

Другие способы заливки

Заливка по Ромейсу способом 1 вариант	Заливка по Ромейсу способом 2 вариант	Заливка в парапласт с помощью автомата	Заливка в парапласт помощью вакуум - автомата.	Быстрая заливка в парапласт с помощью автомата
Фиксация 10% формалин 12ч	10% формалин 12ч	Фиксация в 5% формалине 2ч		Фиксация в 5 % формалине при 60 °C10мин
Промывание я Промывание в проточной воде 2ч	я Промывание в проточной воде -2 ч	Спирт 70 % 12ч	Спирт 70 % 15 мин	Ацетон I 30мин
50% спирт - 2ч	50% изопропиловый спирт 2ч	Спирт 70 % E 1ч	Спирт 70 % II 12 мин	Ацетон II 30мин
75% спирт-3ч	75%-3ч	Спирт 96 % 11ч	Спирт 96 % I 12 мин	Ацетон III 30мин
96% спирт-4ч	90%-6ч	Спирт 96% П 1ч	Спирт 96 % II 12мин	Ацетон IV 30мин
100% спирт -4ч	100% Изопропиловый спирт 1 4ч	Спирт 100 % I 1ч	Спирт 100 % I 12 мин	
100% II -4ч	100% II 4ч	Спирт 100% 2 1ч	Спирт 100 "о II 12мин	
Метилбензоат 1 2ч	Изопропиловый спирт+парафин (1:1) 60°C 12ч	Спирт 100 % 3 1ч	Спирт 100 "о III 12мин	
Метилбензоат II-2ч		Хлороформ (бензол) 1ч	Бензол 1 15мин	Ацетон-ксилол (1:1) 10мин
Бензол-2ч		Хлороформ (бензол) 1ч	Бензол 1[15мин	Ксилол 10мин
Бензол+парафин (1:1)-1 ч		Парапласт I 60 C 2ч	Парапласт плюс 160 C 15мин	
Парафин 60C - 8ч	Парафин 60°C- 8ч	Парапласт П 60 °C 3ч	Парапласт плюс II 60 C	Парапласт плюс 60 С 30мин
			25 мин	
Всего-47ч	Всего-54ч	17ч	12 ч 27мин	3 ч

Наиболее быстрым, простым, не требующим применения специальной аппаратуры методом заливки материала является способ, разработанный И. И. Золотых в патологоанатомическом отделении Института хирургии им. А. В. Вишневского.

1. 96 % спирт - 15 мин
2. 100 % спирт - 15 мин
3. хлороформ - 15 мин
4. хлороформ-парафин при 56°C - 15 мин
5. парафин при 56°C, энергично встряхивая 1 мин
6. парафин при 56°C - 45 мин

Продолжительность - 2 ч 30 мин

Заливка может проходить следующим образом:

1. Формалин 10% - 24 часа
2. промывка проточной водой -1 час
3. спирт 70% (обезвоживание) - больше 4 часов
4. спирт 80% - больше 4 часов
5. спирт 96% - больше 4 часов
6. спирт + хлороформ 1:1 - до 1 часа (пересушивается)
7. хлороформ чистый - до 1 часа
8. хлороформ чистый - до 1 часа
9. хлороформ+парафин 1:1 37°C - до 1 часа
10. парафин 1 56°C - 45 мин
11. парафин 2 56°C - 45 мин
12. в блоки

Для приготовления препаратов следует:

1. ксилол 1 (депарафинизация) 56°C - 10 мин
2. ксилол 2 56C - 10 мин
3. фильтровальная бумага(промокашка)
4. спирт 96% - 5 мин
5. спирт 70% - 5 мин
6. фильтровальная бумага
7. гематоксилин - 5 мин -
8. промываем дистиллированной водой
9. эозин - до 2 мин
10. вода водопроводная
11. спирт макнуть
12. фильтровальная бумага
13. ксилол - больше 10 мин (для просветления)

Особенности заливки в парафин крупных объектов

Заливка в парафин позволяет получать гистологические срезы больших размеров (гистотопографические срезы), например срезы всего органа

(матка, почка) или его значительной части (доля легкого). Заливку проводят вручную, и для нее требуется дополнительное время на всех этапах. Для приготовления таких срезов из ткани головного мозга с помощью мозгового ножа делают срез свежей ткани толщиной около 1 см и закладывают в ванну с фиксатором. Для того чтобы сохранить плоскую конфигурацию среза, его кладут между двумя проволочными сетками, которые притягивают друг к другу резиновыми кольцами. Продолжительность фиксации 48 ч. После промывки в проточной воде (3-4 ч) следует обезвоживание в 70%, 96% и 100% спирте (по 2 смены) в течение 48 ч. Для обезвоживания можно применить изопропиловый спирт, обеспечивая частую его смену и температуру 45°C (в термостате). Это позволяет избежать по-лучения чрезмерно жестких препаратов, В качестве промежуточной среды используют метилбензоат или хлороформ - 3 смены по 3 дня. Объекты заливают в парафин или пара пласт, имеющие температуру плавления 56-58 °C.

Приготовление парафиновых блоков

Пропитанные парафином кусочки ткани выкладывают в специальные формочки и заливают расплавленным в термостате или на водяной бане при 60°C парафином, в который добавлено 1-3 % воска.

Для получения парафиновых блоков нужной формы используют различные приспособления. К ним относятся изготавляемые самим лаборантом бумажные коробочки, на дно которых выкладывают кусочки, а рядом к боковой стенке ставят этикетку номером кнаружи; металлические Г-образные угольники или разъемные формочки, которые перед употреблением смазывают глицерином и помещают на нагретую металлическую пластинку, выполняющую роль дна формочек. Применяют также различные пластмассовые коробочки и формы, в частности, используемые в микробиологии, особенно при заливке мелких объектов, таких как материал пункционных биопсий.

На современном этапе аппараты для заливки в парафин (так называемые заливочные центры) снабжены набором различных формочек (кассет) и пинцетов. В них обеспечивается автоматическая подача дробных доз парафина оптимальной температуры. Последующая резка на микротоме производится после охлаждения парафина непосредственно с кассет.

Раскладывание кусочков в формочки и их ориентирование нужно проводить быстро теплым пинцетом. Если материала для заливки много и он быстро остывает, то можно использовать парафин, подогретый на водяной бане до 60°C, Для охлаждения формочки с материалом рекомендуют помещать в воду при 10-18°C, но не погружать в нее. При застывании парафина поверхность блока стягивается, и в нем образуется кратерообразное углубление. Это нужно учитывать при заливке кусочков и в дальнейшей работе с блоками. Парафин должен на 3-4 мм выступать над поверхностью блока, если предстоит монтировать его на деревянную колодку. Возможны также заливка блока большим количеством парафина и резка без использования деревянных колодок, с успехом применяемая даже на санном микротоме.

В большинстве руководств рекомендуют после подравнивания и удаления лишнего парафина наклеивать блоки на деревянные бруски с помощью подогретого на спиртовке металлического шпателя или скальпеля. Затем для обеспечения более прочного приклеивания основания блок оплавляют с четырех боковых сторон тем же горячим шпателем или скальпелем.

Заливка ткани в целлоидин

Целлоидин — хорошо растворяющаяся в эфире нитроклетчатка. В гистологической практике применяют 2%, 4% и 8% растворы целлоидина, которые готовят из целлоидиновых пластин или отмытой от эмульсии и высушенной рентгеновской пленки. Для приготовления 500 мл 2 % раствора целлоидина 10 г сухого целлоидина заливают 250 мл 100 % спирта и оставляют на 1 сут, затем добавляют 250 мл безводного эфира, который растворяет набухший в спирте целлоидин. Для приготовления 4 % и 8 % растворов количество целлоидина увеличивают соответственно в 2 и 4 раза. Растворы хранят в плотно закрытой посуде.

Заливка ткани в целлоидин стала в настоящее время менее популярной, чем парафиновая, и ее применяют главным образом для обработки трудно режущихся тканей и объектов больших размеров, с которых трудно получить хорошие парафиновые срезы. Целлоидиновую заливку используют также в тех случаях, когда необходимо избежать воздействия на исследуемый материал высоких температур. Кроме того, заливка материалов в целлоидин позволяет получить лучшие результаты при наличии в объектах больших полостей, лакун и слоев различной консистенции.

Эфир и сухой целлоидин огнеопасны, поэтому при работе с ними необходима осторожность.

Обезвоженный материал помещают в смесь 100% спирта с эфиром (1:1) на 4-6 ч, переносят в 2% раствор целлоидина на 2-3 дня, затем в 4% и 8% растворы на 5-7 дней в каждый. Пропитанный кусочек заливают свежим 8 % целлоидином и уплотняют в парах хлороформа (в эксикаторе). Уплотненный таким образом материал заливают 70% спиртом для хранения. Вырезанные блоки наклеивают густым целлоидином на деревянные колодки на 1 сутки перед резкой.

	Заливка в целлоидин по	Заливка в целлоидин по
	Меркулову	Ромейсу
Фиксация:	1.Формалин 10% - 24 ч 2.Жидкость Карнуда 2-4 ч 3.Спирт 96% 12 ч Промывание в воде после формалина 24-48 ч	
Обезвоживание	1.Спирт 96% 24 ч 2. Спирт 100%-24 ч	Спирт-эфир(1:1)-4 - 6 ч Целлоидин 2% 2 дня

Заливка в целлоидин	Спирт 100 % -эфир (1:1) 6 -24 ч 1. Целлоидин 2 % 2-4 дня 2. Целлоидин 4 % - 4 дня 3. Целлоидин 8— 10% 1 - 2 дня 4. Хлороформ 2-3 дня 5. Спирт 70 ЯI хранение	Целлоидин 4% 2 дня Целлоидин 8% 8 дня Целлоидин 16% уплотнение в фиксаторе до образования поверхностной корочки в парах хлороформа. Спирт 70% хранение
---------------------	---	---

Особенности заливки в целлоидин крупных объектов

Целлоидиновая заливка, так же как и заливка в парафин, позволяет получать гистотопографические срезы. Пластины ткани органа толщиной 1 см. кладут между двумя проволочными сетками (как для заливки э парафин), фиксируют, промывают и обезвоживают. Общая продолжительность процесса заливки в целлоидин крупных объектов 2-2,5 мес. С помощью целлоидиновой заливки можно получить гистотопографические срезы толщиной около 20 мкм.

Заливка в целлоидин-парафин

Этот метод рекомендуется для обработки объектов, которые легко сжимаются при парафиновой заливке, например органов кроветворения, мезенхимной ткани, а также органов и тканей, имеющих многослойное строение (трахея, кожа и др.).

Используют также смесь целлоида с касторовым маслом (1:1), пребывание в которой объектов в течение 1—2 дней улучшает их пропитывание, Затем для удаления касторового масла материал промывают в трех порциях хлороформа.

Схема заливки в целлоидин материала для гистотопограмм по Меркулову	Заливка в целлоидин-парафин	Заливка в желатин по Волковой-Елецкому	Заливка в Желатин Гаскелла-Граффа
Формалин 10-15 %	Формалин 10% 24 ч	Формалин 10% 24-	Формалин 10%
1-2 дня	Промывание в про	48ч	48ч
Промывание в проточной воде 24 ч	точной воде 6-12 ч	Промывание	Промывание в
Спирт 70% - 1 -2 ч	Обезвоживание в спиртах 2-3 ч	в проточной воде	водопроводной
Спирт 96% I 1-2 ч	Спирт 100% + эфир	18-24ч	воде 2-6 ч
Спирт 96% II 3-4ч	(1:1)3-6ч	Желатин 12,5% при	Желатин 10%
Спирт 96% III 5 ч	Целлоидин 2%	37°C в закрытой	при 37°C 2-6ч
Спирт 100% 2 ч	1-2 ч	посуде 3-20ч (в зависимости от	Желатин 20%
Спирт 100%+эфир	Хлороформ 18ч	величины объекта)	при 37°C 2-6ч
(1:1) 4-5 дня	Хлороформ +	Желатин 25% при	Заливка в свежую порцию
Целлоидин 2% 2-3ч	парафин (1:1) 37°C	37°C 3-20 ч	10% желатина
Целлоидин 8% 7-10ч	2-3 ч	Заливка свежим	при 37 °C
Хлороформ (уплотнение блоков)	Парафин I 56°C 1-2ч	25 % желатином в	Застывание
4-7 ч	Парафин II при	формочках	формочек с
Спирт 70 %хранение	56°C-1 -2 ч	Застывание в	кусочками в в
		формочках в	холодильнике
		холодильнике	Вырезка блоков
		Формалин 20-25%	Уплотнение
		(уплотнение блоков)	блоков
		24 ч	в 10%

		Формалин 10	формалине
		% хранение	

Заливка в желатин

Для исследования липидов в рыхлых тканях и органах, а также при изучении эмбриональных объектов с успехом применяют заливку в водорастворимый биополимер желатин. Используют прозрачный кристаллический пищевой желатин, из которого ГОТОВЯТ 25% И 12,5% растворы.

К 25 г. желатина добавляют 75 мл 1% водного раствора фенола (карболовая вода) и помещают в термостат при 37 °C. Желатин набухает, и после перемешивания образуется густой 25 % раствор. Из него при разбавлении теплой (37 °C) карболовой водой в 2 раза получают 12,5 % раствор желатина. Приготовленные растворы разливают в чистые сухие пробирки для однократного использования и закрывают пробкой. В застывшем состоянии желатин можно долго хранить в темном прохладном месте.

Схема заливки в желатин по Волковой—Елецкому

Залитый в желатин материал режут на замораживающем микротоме. Из полученных срезов удаляют желатин, чтобы избежать окрашивания фона. Для этого срезы помещают на 30 мин в 10 % раствор гидроксида калия при 37°C. Затем их промывают в водопроводной воде и окрашивают. Окрашенные срезы заключают в поливиниловый спирт или глицерин-желатин.

Приготовление поливинилового спирта: порошок поливинилового спирта отмывают в 96 % спирте (2 смены), эфире (3 смены) и высушивают. К 16 г отмытого порошка добавляют 100 мл дистиллированной воды, оставляют на 12 ч для набухания. Полученную массу нагревают в течение 20—30 мин на кипящей водяной бане. На поверхности густой мутноватой жидкости образуется пленка с пузырями, которую удаляют, а раствор фильтруют через 4 слоя марли. Поливиниловый спирт можно использовать как промежуточную среду для получения постоянных препаратов после резки на замораживающем микротоме. Сначала на срез, расправляемый на стекле, наносят поливиниловый спирт, затем после образования тонкой пленки (через 6—12 ч) препарат заключают в полистирол или бальзам.

Приготовление глицерин-желатина: к 7г. желатина добавляют 41 мл дистиллированной воды и оставляют для набухания 3—4 ч. Затем добавляют 50 мл глицерина и 1 г фенола. Смесь нагревают на водяной бане, постоянно помешивая. Раствор фильтруют через крупнопористый фильтр, разливают по пробиркам, закрывают пробками и хранят в холодильнике.

Срезы ткани, залитой в желатин, полученные на замораживающем микротоме, можно обезводить в спиртах, просветлить в карбол-ксилоле и заключить в бальзам или полистирол.

В других схемах рекомендуют иные концентрации желатина и продолжительность пребывания в нем объектов.

Заливка в водорастворимые пластмассы.

Для целей гистохимии, особенно для выявления липидов и ферментов, хорошо себя зарекомендовала заливка ткани в синтетические водорастворимые пластмассы - полиэтилен гликоль, поливакс, метилметакрилат и др.

Заливка в полиэтиленгликоль различной молекулярной массы по Ринерхарту-Абуль-Хею Вариант 1	Заливка в полиэтиленгликоль различной молекулярной массы по Ринерхарту-Абуль-Хею Вариант 2	Заливка в поливакс по Стидмену	Заливка в метилметакрилат по Хиршу—Болларду
Формалин 5% 24-48ч	Формалин 5% 24-48 ч	Формалин 5 % 6-24 ч	Формалин 5 % 6- 12 ч
Промывание в проточной воде 12ч	Промывание в проточной воде 12 ч	Промывание в проточной воде 6-12ч	Промывание в 70 % спирте 10 м
Полиэтиленгликоль-400 + дистиллированная вода (1:1) 30м	Заливка смесью полиэтиленгликоль-1550 + полизтиленгликоль-4000 (1:9) при 1-3ч	Обезвоживание в 70 % и 96 % спиртах	Споласкивание в 96 % спирте 2 м
Полиэтиленгликоль-400 + дистиллированная вода (5:1) 30м	Заливка свежей порцией смеси при 58 С 30 м	24 ч	Спирт 96 % 2 ч
Полиэтиленгликоль-400 30м	Заливка смесью при 58°C	Спирт 96 % + поливакс (1:1) 2ч	Метилметакрила Т 2 ч
Полиэтиленгликоль-1000 40°C 30 м		Поливакс 40°C 3ч	Смесь (А+Б+В+Г) при 50°C
Заливка смесью полиэтиленгликоль-1550 + полиэтиленгликоль-4000(1:9) при 58C 30 м		Свежая порция поливакса при 40°C 3ч	2ч
		Заливка на поливакс при 40°C	Свежая порция этой смеси при 50-60 °C 6-10ч
		Застывание блоков	Затем материал
		При комнатной температуре	выдерживают при комнатной температуре в течение 1 суток

Заливка в полиэтилен гликоль различной молекулярной массы по Ринерхарту-Абуль-Хею

Срезы с залитых в полиэтилен гликоль блоков готовят на замораживающем микротоме, окрашивают, помещают на предметное стекло и заключают в смесь глицерина и желатина или раствор диэтиленгликоля (диэтиленгликоля — 4 части, дистиллированной воды — 5 частей, 40 % формалина — 1 часть).

Данные	Причина	Устранение
Крошится парафин	Слишком твёрд Медленно охлаждался при заливке Низкая t окружающей среды Большой угол наклона ножа	Подышать на блок Изменить угол наклона ножа Перезалить объект
Ткань отделяется от парафина	Заливка проводилась холодным парафином Плохая пропитка материала При проводке остались следы спирта	Перезалить блок, предварительно поместив его в промежуточную среду для удаления спирта
Материал плохо режется ткань белесоватого цвета срезы сморщенные, плохо расправляются	Недостаточное обезвоживание ткани	Блок расплавляют в термостате и пропускают по батарее в обратном порядке до 100% спирта, затем снова заливают по схеме.
Нож «подскакивает», не срезая ткань или на срезах образуются поперечные борозды	Переуплотнение или просушивание материала при фиксации или обезвоживании	Резать материал, поместив на него кусочек льда. Взять из архива новый и провести по схеме
Срезы сморщенные, прилипают к поверхности ножа, закручиваются	Недостаточный угол наклона ножа Высокая температура в помещении Материал залит в легкоплавкий парафин	Изменить угол наклона ножа Перед срезами материал поместить в холодильник Перезалить более тугоплавкий парафин
Срезы покрыты полосами и легко раскрываются	Плохое качество ножа: .зазубрины Загрязнение парафина: плотные соринки Наличие в ткани солей кальция	Сменить или передвинуть нож Декальцинировать Использовать специальные ножи (для керамики, синтетики, плотны тканей)
Срез прилипает к ножу	электризация	Подышать на блок

Заливка в поливакс по Стидмену

Поливакс (полиэстер вакс) представляет собой смесь поли этил ен-глико ля- 400-дистеарата и ацетил ал ко го л я в соотношении 9:1.

Заливка в метилметакрилат по Хиршу-Болларду Смола имеет сложный состав и состоит из четырех компонентов, которые смешивают в определенной последовательности:

1. 10 мл метилметакрилата (А)
2. + 5 мл полиэталенгликоля (Б)
3. + 3 мл дибутилфталата (В)
4. + 0,2 г бензоилпероксида (Г).

Микротомирование

- представляет собой изготовление тонких срезов на **специальном** приборе

- микротоме, Толщина срезов, предназначенных для световой микроскопии, не должна превышать 4—5 мкм, для электронной — 50—60 нм.

Для парафиновых блоков используется плоский-плоский микротом (нож), а для других - плоский-вогнутый. Угол: 13-15 градусов. Сначала равняют поверхность, потом срезают и помещают в воду при 35-40°C, (если в воду добавить несколько капель казеинового клея, то фиксация будет намного лучшей и отсутствует фон), после чего вылавливают на обезжиренные предметные стёкла. Во время срезов целлоида поверхность обильно смачивают спиртом с помощью кисточки. После этого стекло со срезом подсушивают (6-12 часов при 37°C или 10-15 мин при 56°C). Во втором случае срез лучше фиксируется, но требует дополнительной порции ксилола и увеличения продолжительности депарафинизации.

Способ для отличных по качеству срезов - сушка на спиртовке или нагреваемом столике.

Подготовка предметных стекол

На современном этапе предметные стекла специально упакованы и готовы к использованию. Предметные стекла, применяемые для получения гистологических препаратов, применяемые повторно, необходимо предварительно подготовить,

1. Моют в тёплой мыльной воде или кипятят 2-3% растворе гидрокарбоната натрия.
2. Ополаскивают горячей водой.
3. Промывают проточной водой несколько часов.
4. Протирают тканью
5. Обезжиривание: помещают на несколько суток в смесь Никифорова: эфир + 96% спирт или на несколько дней помещают в крепкий раствор соляной кислоты или 100 гр. бихромата калия растворяют в 1000 мл. горячей воды, охлаждают и по стеклянной палочке по каплям добавляют концентрированную серную кислоту. Выдерживают 2-3 дня, промывают 1 - 2 дня.

Контроль: капля воды по обезжиренному стеклу расходится тонким слоем, а не собирается каплей.

6. Извлекают пинцетом, протирают и складывают в коробочку.

Для лучшей фиксации срезов на стекле его предварительно смазывают:

1. Смесью белка с глицерином (свежий яичный белок взбивают, фильтруют через крупнопористый фильтр, смоченный дистиллированной водой, размешивают с равным количеством глицерина и добавляют несколько кристаллов тимола. Смесь хранится несколько месяцев,
2. Либо 15 мл сыворотки крови + 5мл дистиллированной воды + 6мл - 5% формалина и фильтруют. Она лучше предыдущей, так как не даёт фон.
3. Либо готовыми заводскими растворами для лучшей фиксации срезов на

стеклах.

Для нанесения белка на обезжиренные предметные стекла в одну руку берут 5—6 стекол в виде веера, а в другую - чистую стеклянную палочку, которой наносят белок, прикасаясь к каждому стеклу. Затем белок растирают обезжиренным спиртом пальцем по поверхности стекла до его середины, прилагая большое усилие. Некоторые авторы рекомендуют натерты белком стекла прогревать в термостате, но опыт показывает, что это излишне, так как после переноса срезов на стекла их помещают в термостат или на специальный столик для просушивания, где одновременно происходит коагуляция белка.

Разработан способ фиксации среза к предметному стеклу без предварительного натирания последнего белком с глицерином. В ванночку с теплой дистиллированной водой капают несколько капель жидкого казеинового клея и перемешивают. В полученную мутноватую жидкость опускают срезы, расправляют препарovalной иглой и вылавливают на чистое обезжиренное стекло. Этот способ дает неизменно хороший эффект и вокруг среза отсутствует окрашенный фон, как это часто бывает при применении белка.

СХЕМА ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДО ПРОЦЕССА ОКРАШИВАНИЯ ПРИ СПИРТОВОЙ (ЭТИЛОВЫЙ СПИРТ) ПРОВОДКЕ

Фиксация	10% формалин	24 часа
Промывка	Вода проточная	1 час
Обезвоживание	70% спирт	4 часа и более
	80% спирт	
	96% спирт	
	Хлороформ-спирт 1/1	До 1 часа
	Хлороформ чистый	До 1 часа
	Хлороформ чистый	До 1 часа
	Хлороформ- па рафии 1/1 17С	До 1 часа
	Парафин 1 - 56С	45 мин
	Парафин 2 - 56С	45 мин
Депарафинизация	Ксиол 1 - 56С	10 мин
	Ксиол 2 - 56С	10 мин
	Фильтровальная бумага	
	Спирт 96%	5 мин
	Спирт 70%	5 мин
	Фильтровальная бумага	
	Гематоксилин	5 мин
	Водой	
	зозин	До 2 мин
	Вода водопроводная	
	Спирт макнуть	
	Фильтровальная бумага	
	Чистый ксиол для просветления 56С	Больше 10 мин

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ МЗ РК от 20 мая 2010г. № 368) - Астана, 2010
2. Г. А. Меркулов. Курс патологической гистологической техники. — 1967.
3. Микроскопическая техника: Руководство / Под редакцией Д.С. Саркисова и Ю.Л.Перова. — М.: Медицина, 1996. ISBN 5-225-02-820-9).