

Л.В. Дегтярьова, Н.О. Гребеньщикова

### Артефакти при гістологічних і гістохімічних дослідженнях: причини виникнення, шляхи запобігання

Інститут сорбції та проблем ендоекології НАН України, Київ

**Ключові слова:** гістологічні та гістохімічні дослідження, артефакти.

На підставі багаторічного особистого досвіду і даних керівництв з гістологічної і гістохімічної техніки узагальнено відомості про можливі причини виникнення артефактів на певних етапах гістологічних і гістохімічних досліджень та шляхах їх запобігання.

#### Artefакты при гистологических и гистохимических исследованиях: причины возникновения, пути предотвращения

Л.В. Дегтярева, Н. А. Гребеньщикова

На основании многолетнего личного опыта и данных руководств по гистологической и гистохимической технике обобщены сведения о возможных причинах возникновения артефактов на определенных этапах гистологических и гистохимических исследований и путях их предотвращения.

**Ключевые слова:** гистологические и гистохимические исследования, артефакты.

*Патология. – 2009. – Т.6., №1. – С. 100-104*

#### Artefacts at histological and histochemical researches: reasons of origin, means of prevention

L.V. Degtyarova, N.O. Grebenshchikova

In this article the information about the possible reasons of origin of artefacts on certain stages of histological and histochemical researches and ways of their prevention are generalized on the basis of the long-term personal experience and details from textbooks on a histological and histochemical technique.

**Key words:** histological and histochemical investigation, artefacts.

*Patologia. 2009; 6(1): 100-104*

Багаторічний особистий досвід роботи в лабораторії гістології та гістохімії дозволяє нам звернути увагу колег на окремі принципові моменти обробки досліджуваного матеріалу, які, на наш погляд, значимі щодо якості препаратів для мікроскопії і, отже, результатів морфологічної діагностики.

Загальновідомо, що якість гістологічних і гістохімічних препаратів залежить від багатьох чинників, першочергово – від фіксації матеріалу [1-9 та ін]. На цьому етапі вкрай важливими є уявлення про дію певних фіксаторів на живі структури, знання характеристик досліджуваного матеріалу і задач дослідження. Для вибору оптимального фіксатора суттєвий також чинник часу, відведеного для дослідження (його терміновості). Слід пам'ятати про різноманітність фіксуючих засобів, серед яких є прості фіксатори (тільки фіксуюча речовина: спирт, ацетон, формалін) і складні (фіксуючі суміші), і враховувати їх вплив на структури тканин. Хороша фіксація з якнайменшою зміною прижиттєвої архітекτονіки – результат, якого бажано досягти. Проте, серед відомих на сьогодні фіксаторів немає жодного ідеального, який би відповідав усім зазначеним вимогам. Так, велика частина фіксуючих середовищ дає кислу реакцію, що спотворює ультраструктуру клітин через підвищену чутливість основної речовини цитоплазми до кислот [3]. Тому концентрація іонів водню у фіксаторі має відповідати їх нормальному рівню в тканинах (рН 7,2). Але при доведенні рН до нейтральних величин спроможність консервувати речовини істотно знижується. На щастя, при світлооптичній мікроскопії ця проблема, хоч і важлива (особливо для гістохімічного аналізу), все ж не є критичною на відміну від електронної (особливо електронної гістохімії).

Фіксуюча дія спирту базується на дегідратації структур з мінімальним порушенням молекулярної будови білків.

У ньому зберігаються деякі речовини, які розчиняються частково або повністю в інших рідинах (глікоген, муцини, сечова кислота, кальцій, залізо). Однак жири, сполуки холестерину, хромафінна субстанція розчиняються й екстрагуються. Внаслідок втрати води і жиру цитоплазма зморщується, значно спотворюючи прижиттєвий стан клітин. При цьому зморщення ядер виражене набагато менше. Доведено, що спиртові фіксатори є головною причиною виникнення поляризації глікогену (тобто скупчення його гранул на одному з полюсів клітини) при звичних температурах [7]. При їх використанні спостерігалися кількісні відмінності щодо вмісту глікогену в зрізах з поверхні і з глибини блоку. Присутність у складі фіксатора оцтової кислоти спричинює укрупнення гранул глікогену. Водні ж фіксатори, як правило, зменшують поляризацію і, відповідно, різницю між поверхневими і глибокими частинами блоку. Проте фіксація спиртом або спиртовими сумішами залишається незамінною для багатьох спеціальних досліджень.

Ацетон зневоднює колоїди, відбирає сольватну оболонку у білкових молекул. Коагуляція білків під впливом ацетону значною мірою зворотна (неглибокі зміни білкових молекул уможливають відновлення після додавання води). Фіксація чистим ацетоном протікає швидко, що має сенс при терміновій діагностиці, але сильне зморщення тканин і клітин призводить до виникнення артефактів їх деформації, неприпустимих при тонких дослідженнях [1, 5, 6]. Тому застосовувати його рекомендується лише в поєднанні з іншими фіксуючими агентами [8]. А щоб фіксація матеріалу була максимально ефективною, його шматочки мають бути невеликих розмірів.

Формалін (як простий фіксатор і у складі багатьох фіксуючих сумішей) найчастіше застосовують в патологічній гістології. Його вважають універсальним

фіксатором для тканин людини, тварин і рослин та використовують при вивченні багатьох речовин (білків, нуклеїнових кислот, деяких вуглеводів, ферментів, мінеральних сполук) [2]. Унаслідок хорошої дифузійної здатності і незначної коагуляційної він швидко та глибоко проникає в тканини і швидко їх фіксує, тому може застосовуватися для фіксації великих об'єктів. Стабілізуюча дія визначається утворенням поперечних зв'язків [4]. На відміну від інших фіксаторів (наприклад, ацетону), він не спричиняє різкого зморщування тканин. При консервації шматочків матеріалу у формаліні їх можна протягом років зберігати в 10% розчині без втрати здатності забарвлюватися [1]. Якщо матеріал унаслідок тривалого зберігання став дуже щільним, його можна пом'якшити, помістивши на 14 днів в 10% розчин лимонної кислоти [8]. Але при тривалому зберіганні у формаліні в матеріалі можуть утворитися темно-коричневі пігментні кристали, які осідають в тканинах і спотворюють мікроскопічну картину. Щоб уникнути цього, матеріал після фіксації необхідно ретельно промивати в проточній воді. Слід, однак, уникати занадто тривалої промивки (до 24 годин!), бо виникає мацерація тканин.

При багатьох перевагах формалінової фіксації, необхідно зважати і на її недоліки. Так, в розчинах формаліну частково розчиняються нуклеїнові кислоти, деякі білки, ліпіди, інактивуються білкові функціональні групи, змінюється будова насичених карбонових кислот [2, 8]. Формалін мало придатний для фіксації глікогену, сечової кислоти, сполук заліза і кальцію (останніх – через зниження рН розчину фіксатора у зв'язку з неминучим утворенням кислоти в процесі фіксації) [7]. У тканинах, багатих кровоносними судинами, просочених кров'ю, при гемолізі утворюються темнокоричневі, безладно розташовані кристали так званого «формалінового пігменту» – виникають артефакти. Треба також пам'ятати, що формалін, наявний у продажу, завжди містить домішки мурашиної кислоти, метилового спирту [8] і, можливо, ацетону [2], які негативно позначаються на процесі фіксації. Незначний вміст кислоти при загальноприйнятій обробці матеріалу особливо впливає на хід фарбування не має, проте для ряду методів (особливо сріблення, виявлення залізовміщуючих пігментів, забарвлення азур-еозином) формалін повинен бути позбавленим кислоти. Нейтралізувати його можна різними способами, але переважним є варіант забуференого формаліну, який допомагає уникнути таких артефактів, як сильне стиснення матеріалу, деформація клітин, виникнення «формалінового пігменту» [3]. Реакція забуференого розчину, завдяки наявності фосфатів натрію, близька до нейтральної. Приготувати його нескладно: нерозбавлений (100%) формалін (або 40% формальдегід) – 100мл, дистильована вода – 900мл, однозаміщений фосфат натрію (моногідрат) або  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 4г, безводний двоаміщений фосфат натрію ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) – 6,5г.

Завершуючи зауваження з приводу фіксації матеріалу,

повторимо відому істину: не існує такої фіксуючої рідини, яка однаково добре зберігала б всі структури клітин і тканин. Тому рекомендують використовувати різні фіксатори, комбінуючи їх з формаліном або застосовуючи додаткову фіксацію після формаліну.

Фіксовані об'єкти не завжди мають необхідні для різання властивості (оптимальні щільність, розміри, однорідність) і потребують просочення середовищем, що ущільнюється в масу, яка добре ріжеться. Найпоширенішим в наш час є заливання у парафін [9]. Воно дозволяє виготовляти дуже тонкі зрізи (до 5 мкм) і їх безперервні серії (на відміну від заливання в целоїдин), а також дає можливість одержувати зрізи з дуже маленьких шматочків тканин. Крім того, парафінова заливка швидша і простіша ніж целоїдинова, а залиті зразки можна зберігати як завгодно довго без побоювання, що вони зміняться.

При виготовленні парафінових блоків для просочення тканин парафіном необхідно видалити з них залишки фіксуючої рідини, а також воду або спирт, якими промивали матеріал після фіксації, і замінити їх розчинником парфину. Оскільки більшість таких розчинників не змішується з водою, наступним за фіксацією етапом обробки матеріалу, як відомо, є його дегідратація, здійснювана проведенням через ряд спиртів зростаючої концентрації. Поступовість зневоднення має велике значення для отримання препаратів високої якості [8]. Час перебування матеріалу в розчинах спирту залежить від виду тканини, розмірів шматочка і температури рідини. Тут слід пам'ятати: чим делікатніший об'єкт, тим більша небезпека його стиснення і зморщення.

Одні й ті ж спирти не слід використовувати дуже багато разів, оскільки вони забруднюються екстрагованими з матеріалу речовинами, особливо жирами. Спирти не повинні бути каламутними. Для перевірки їх насиченості жирами, треба невелику кількість спирту з батареї змішати з водою і, якщо з'явиться біла густа каламутність (емульсія), то спирт необхідно замінити чистим. Повторне використання спиртів можливе лише в тих випадках, коли у суміші з водою виникає дуже слабке помутніння. При утворенні хмари каламуті навколо шматочків і на дні банки, спирт вважається абсолютно непридатним для роботи.

При завершенні процедури дегідратації в абсолютному спирті потрібно пам'ятати про те, що тривале (понад 24 години) перебування в ньому матеріалу призводить до затвердіння різних тканинних структур, що утрудняє різання. Наслідком же неповного зневоднення матеріалу є його погане просочення парафіном або ж іншими середовищами для заливання і недостатнє ущільнення, що створює проблеми при різанні блоків. Зрізи або неможливо одержати взагалі, або вони виходять дуже товстими, що ускладнює дослідження.

Основним правилом етапу дегідратації матеріалу є поступове підвищення концентрації спиртів у батареї для плавного (повільного) заміщення води в тканинах спиртом, без їх руйнування.

Подальша підготовка матеріалу для просочення й

ущільнення його парафіном та виготовлення парафінового блоку включає процедуру заміщення спирту, який не розчинює парафін, на розчинник останнього. У багатьох лабораторіях для цього використовують хлороформ, який добре змішується зі спиртом і виконує роль проміжного середовища між зневодненням матеріалу та власне заливанням. При цьому слід зауважити, що для бездоганного просочення парафіном повне видалення спирту з тканин після їх дегідратації не менш важливе, ніж видалення води [1, 3, 8].

При проведенні через порції хлороформу, потім суміш його з парафіном і ряд парафінів може відбутися пересушування матеріалу, якщо порушуються температурні та часові параметри процедури. В результаті матеріал стає крихким, і в зрізах можуть виникати артефакти (зсунуті, розірвані, зруйновані структури). Використання двох чи більше порцій парафіну для просочення об'єктів пояснюється необхідністю звільнити тканини від хлороформу (чи іншого проміжного середовища), домішка якого зменшує пластичність парафіну, робить його кришкуватим.

Якість препаратів суттєво залежить від характеристик середовища для заливання (парафіну) та дотримання температурного режиму процедури [1, 2, 5, 6, 8]. З наявних у продажу видів парафіну вибирається такий, що має точку плавлення не вище 52-54° С. У дуже теплих приміщеннях, в спекотному кліматі краще користуватися парафіном з вищою точкою плавлення (56° С), при холодній температурі повітря – з нижчою (50° С). Для більшої пластичності парафіну до нього додають 5% (від ваги) бджолиного воску, а щоб позбавитися газових домішок, витримують в термостаті при 70° С у відкритих стаканах протягом декількох діб. Температура парафіну при заливанні матеріалу має бути трохи вищою від точки плавлення (на 2-3° С). При охолодженні та затвердінні парафіну слід пам'ятати, що чим швидше воно відбувається, тим менше його кристали й однорідніша консистенція, і тим краще ріжуться блоки. Для швидкого охолодження форми із залитим в парафін матеріалом переносять у посудину з холодною водою (оптимальна температура 10-18° С); при використанні холоднішої води відбувається сильне стягування блоку з боків і знизу з можливим утворенням тріщин [8]. До того ж дуже швидке затвердіння парафіну, ймовірно, спричинює порушення його кристалізації й утворення ділянок зі зниженою щільністю. Наявність в парафіні пухирців повітря та різної форми молочно-білих зернистих ділянок, як правило, пов'язане з недостатнім видаленням проміжних середовищ або ж із нерівномірним охолодженням.

Під час просочення досліджуваного матеріалу і заливання у парафін потрібно дотримувати певних правил: а) змінювати склад середовищ, через які проводиться шматочок, поступово, використовуючи в процедурі проміжні суміші з передуючого і наступного середовищ (наприклад, спирт-хлороформ, хлороформ-парафін); б) уникати коливання температури термостата, не допускати

перегріву шматочка; в) не перетримувати шматочки в проміжних і заливальному середовищах; г) якнайшвидше охолоджувати парафін після заливання.

При приготуванні зрізів потрібно не забувати про деякі умови їх успішного отримання. По-перше, якщо парафін дуже м'який, зрізи сильно зморщуються, тканини стискаються під ножем, а якщо твердий – зрізи скручуються, кришаться. Ущільнити парафінові блоки можна їх охолодженням в крижаній воді або холодильнику, і можна різати їх охолодженим ножем. Для зігрівання (і розм'якшення) блоків біля їх держака можна розмістити електричну лампу або перед кожним зрізом дихати на блок. Останній прийом ефективний також щодо усунення електростатичного заряду і прилипання зрізів до предметів, розташованих поряд. По-друге, неправильно підібраний кут нахилу ножа відносно блоку призводить до розламування та зморщення зрізів. По-третє, надто прямовисне положення ножа здатне руйнувати тонкі клітинні структури без істотного порушення зовнішньої форми зрізу, що виявляється лише при мікроскопії. По-четверте, поява на зрізі поздовжніх смуг або щілин зумовлена щербинами на лезі ножа, або наявністю в парафіні або залитій тканині піщинок, кальцієвих відкладень, найдрібніших кісткових фрагментів, або ж налипанням парафіну на лезо. По-п'яте, залишки проміжного середовища або газоподібні домішки у парафіні спричинюють його розкришування й розмазування. По-шосте, наявність молочно-білих ділянок самої тканини, які погано ріжуться, зв'язані чи то з неповним видаленням води, спирту, проміжного середовища, чи то з дуже швидким охолодженням блоку з усіх боків (під водою). По-сьоме, якість одержуваних зрізів залежить також від гостроти леза, швидкості і плавності пересування мікромомного ножа.

Хочеться нагадати ще про два чинники, які впливають на якість препаратів, що виготовляються. Це – вода, на яку поміщають виготовлені зрізи, і предметні стекла. Бажано застосовувати дистильовану воду (та ще й прокип'ячену для попередження появи пухирців повітря) і міняти її якомога частіше, що також попереджатиме появу артефактів. Якщо вода змочує предметне скло нерівномірно, це свідчить про його неповне знежирення і можливість поганого приклеювання зрізів, що створює проблеми при забарвленні препаратів. Добре приклеєні зрізи при розгляді з боку скла в похилому положенні повинні бути абсолютно матовими (наявність дзеркально відсвічуючих ділянок свідчить про наявність повітря між зрізом і склом).

Виникнення артефактів можливе також в процесі забарвлення препаратів при неповному звільненні зрізів від частинок середовища, в яке залитий матеріал, та при попаданні кристалів барвників на зріз. Щоб уникнути останнього, розчини забарвлюючих сумішей необхідно фільтрувати безпосередньо перед застосуванням.

Нижче згруповані артефакти, які найчастіше зустрічаються, та їх можливі причини (таблиця).



**Можливі причини найчастіших артефактів при виготовленні гістологічних препаратів**

Артефакт	Причини
Досліджуваний матеріал стислий, затверділий, погано або зовсім не ріжеться	<ul style="list-style-type: none"> <li>• переущільнення при фіксації та проводці;</li> <li>• погане зневоднення і недостатнє видалення спирту при проводці;</li> <li>• дуже гарячий парафін при просоченні або заливанні</li> </ul>
Зрізи кришаться	<ul style="list-style-type: none"> <li>• матеріал погано просочений парафіном;</li> <li>• твердий парафін і низька температура приміщення;</li> <li>• повільне охолодження парафіну при заливанні;</li> <li>• великий кут нахилу ножа</li> </ul>
Зрізи зморшкуваті, погано розправляються	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дуже м'який парафін (можна охолодити блок);</li> <li>• висока температура навколишнього середовища;</li> <li>• теплий ніж та/або блок;</li> <li>• малий кут нахилу ножа;</li> <li>• дуже тонкі зрізи;</li> <li>• незагвинчені кріпильні гвинти мікротома</li> </ul>
Зрізи закручуються	<ul style="list-style-type: none"> <li>• твердий парафін;</li> <li>• висока температура навколишнього середовища;</li> <li>• м'який парафін (зрізи краще поміщати спочатку на холодну воду, щоб їх можна було розкрутити препарувальною голкою, і лише потім додати теплої води для остаточного розпрямлення);</li> <li>• малий кут нахилу ножа</li> </ul>
Зрізи повністю розщеплені, рвуться, з поздовжніми подряпинами і смугами	<ul style="list-style-type: none"> <li>• щербини на лезі ножа;</li> <li>• брудне лезо (прилипли тверді частинки);</li> <li>• кісткові фрагменти, відкладення кальцію, чужорідні тіла (нитки або кристали) в тканині;</li> <li>• піщинки або ін. тверді частинки в парафіні</li> </ul>
Подряпини, смуги або розщеплення на частині зрізу	<ul style="list-style-type: none"> <li>• бруд або чужорідні тіла в парафіні;</li> <li>• кальцій або чужорідні тіла в тканині</li> </ul>
Зрізи прилипають до навколишніх предметів	<ul style="list-style-type: none"> <li>• електризація зрізів (подихати на зрізи і блок)</li> </ul>
Товсті або нерівномірні за товщиною (товсті і тонкі) зрізи	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дуже великий блок;</li> <li>• незагвинчені гвинти, що закріплюють блок;</li> <li>• неоптимальний (недостатній) кут нахилу ножа;</li> <li>• іржаві держачи ножа або змінного леза;</li> <li>• тупий ніж;</li> <li>• повільний рух ножа;</li> <li>• непарафіновий блок або тканина дуже тверді для різання без замочування;</li> <li>• дефекти проводки і заливання тканини</li> </ul>
Зсув окремих тканинних і клітинних структур з місць їх типової локалізації	<ul style="list-style-type: none"> <li>• тупий ніж;</li> <li>• прямовисне положення ножа;</li> <li>• невідповідна швидкість руху ножа;</li> <li>• теплий ніж та/чи блок;</li> <li>• дуже тонкі зрізи;</li> <li>• незагвинчені кріпильні гвинти мікротома</li> </ul>
Неоднакові за величиною зрізи	<ul style="list-style-type: none"> <li>• блок грубо обрізаний або розташований криво відносно ножа</li> </ul>
Зрізи з нерівними бічними сторонами, зігнуті, викривлені	<ul style="list-style-type: none"> <li>• нестандартне (не відповідає вимогам) лезо ножа;</li> <li>• непаралельні ніж і блок;</li> <li>• блок не квадратний або не прямокутний</li> </ul>
Зрізи з дірками або товстими і тонкими ділянками (неоднорідні)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• недостатнє зневоднення і видалення проміжних середовищ при проводці тканини</li> </ul>
Стрічки зрізів не утворюються	<ul style="list-style-type: none"> <li>• тупий ніж;</li> <li>• дуже теплий блок;</li> <li>• неправильний кут нахилу ножа;</li> <li>• не загвинчені частини мікротома;</li> <li>• недосконала проводка тканини</li> </ul>
Зрізи каламутні, погано структуровані	<ul style="list-style-type: none"> <li>• спирти, забруднені екстрагованими ліпідами й іншими сполуками при багаторазовому використанні;</li> <li>• неповна дегідратація матеріалу</li> </ul>

Дотримуючись вище зазначених рекомендацій, можна уникнути багатьох неприємностей для отримання досконалого результату.

**Література**

1. Вайль С.С. Руководство по патолого-гистологической технике. – Л.: Медгиз, 1947. – 264 с.
2. Кононский А.И. Гистохимия. – К.: «Вища школа», 1976. – 280 с.
3. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия: Пер. с англ. / Под ред. В.В.Португалова. – М.: Мир, 1969. – 648 с.
4. Луппа Х. Основы гистохимии. – М.: Мир, 1980. – 344 с.

5. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 424 с.

6. Основы гистологии и гистологической техники / Афанасьев Ю.И., Баланчук В.К., Ванников Л.Л., и др. всего 5 авт. / Под ред. В.Г. Елисева, М.Я. Суубботина, Ю.И. Афанасьева, Е.Ф. Котовского. – М.: Медицина, 1967. – 268 с.

7. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная: Пер. с англ. / Под ред. В.В.Португалова. – М.: Иностранная литература, 1962. – 964с.

8. Ромейс Б. Микроскопическая техника: Пер. с нем. / Под ред. И.И.Соколова. – М.: Иностранная литература, 1953. – 719 с.

9. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

**Відомості про авторів:**

Дегтярьова Лариса Вікторівна – д.мед.н., проф., ст.н.с. інституту сорбції та проблем ендоекології НАН України, тел. 8(044) 4525452; моб. 8(050) 3578019

Гребеньщикова Надія Олександрівна – лаборант-гістолог