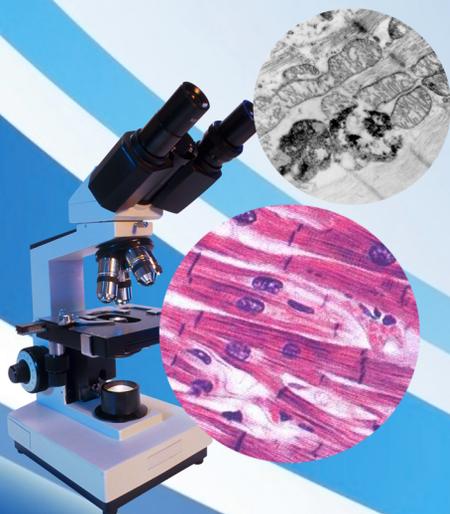


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ



УФА 2018

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ
МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

Уфа

2018

УДК 616-091:572.7(072.8)

ББК 52.512

С56

Рецензенты:

Заведующий кафедрой патологической анатомии
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия»
Минздрава России д.м.н., профессор *Н. А. Кирьянов*

Главный внештатный специалист по патологической анатомии МЗ РБ,
заведующий РПАБ ГУЗ РБ РКБ им. Г.Г. Куватова,
Заслуженный врач РБ и РФ *В.Н. Ткаченко*

С56 **Современные методы морфологической диагностики: учеб.-метод. пособие/ сост.: Т. И. Мустафин, А. В. Двинских, Д. С. Куклин, И. А. Шарифгалиев. – Уфа: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2018. – 120 с.**

Пособие подготовлено на основании рабочих программ (2016 г.), действующих учебных планов (27.06.2017 г.) и в соответствии с требованиями ФГОС ВО, ООП для изучения дисциплин «Патологическая анатомия, клиническая патологическая анатомия», по специальностям лечебное дело 31.05.01 и педиатрия 31.05.02, «Патологическая анатомия» по специальностям медико-профилактическое дело 32.05.01 и стоматология 31.05.03.

Представлены сведения по применению современных методов исследования в патологической анатомии.

Предназначено для обучающихся по специальностям лечебное дело, педиатрия, медико-профилактическое дело, стоматология и направлено на освоение профессиональных компетенций ОПК9, ПК5, ПК6.

Рекомендовано в печать Координационным научно-методическим советом и утверждено решением Редакционно-издательского совета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

УДК 616-091:572.7(072.8)

ББК 52.512

© ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2018

© Мустафин Т. И., Двинских А. В.,

Куклин Д. С., Шарифгалиев И. А., 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
Глава 1. Современные методы морфологической диагностики. Классификация.....	7
Глава 2. Материал и объекты морфологического исследования.....	12
2.1. Прижизненное исследование.....	12
2.1.1. Операционный материал.....	13
2.1.2. Биопсийный материал.....	14
2.1.3. Послед.....	19
2.2. Посмертное исследование. Трупный материал.....	20
2.3. Экспериментальный материал.....	28
2.4. Объекты морфологического исследования.....	30
Глава 3. Методы визуализации объектов морфологического исследования.....	45
3.1. Макроскопический метод.....	45
3.2. Микроскопические методы.....	46
3.2.1. Световая микроскопия.....	47
3.2.2. Электронная микроскопия.....	55
Глава 4. Методы идентификации объектов морфологического исследования.....	57
4.1. Базовая и селективная цито-, гистологическая окраска.....	57
4.2. Гисто-, цитохимическая реакция.....	61
4.3. Импрегнация солями металлов.....	66
4.4. Флюорохромия.....	69
4.5. Иммуноморфологические реакции.....	72
4.6. Радиоактивная метка (радиоавтография).....	76
4.7. Методы молекулярной биологии.....	79
5. Патологоанатомический инструментарий.....	84
5.1. Определение, номенклатура, история, классификация.....	84
5.2. Общие патологоанатомические инструменты.....	86
5.3. Специальные патологоанатомические инструменты.....	98
Контрольные вопросы.....	103
Тестовые задания.....	104
Ситуационные задачи.....	109
Эталоны ответов к тестовым заданиям и ситуационным задачам.....	111
Рекомендуемая литература.....	114
Приложения.....	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание

ИГХ - иммуногистохимия

МРТ – магнитно-резонансная томография

МФА – метод флюоресцирующих антител

МЦР – микроциркуляторное русло

ПА – патологическая анатомия

ПИ – патологоанатомический инструментарий

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РАГ - радиоавтография

РИФ – реакция иммунофлюоресценции

СМ – световая микроскопия

УЗДГ – ультразвуковая доплерография

УЗИ – ультразвуковое исследование

УФЛ – ультрафиолетовые лучи

ФЭГДС – фиброэзофагогастродуоденоскопия

ФКС – фиброколоноскопия

ЭМ – электронная микроскопия

ЭхоКГ – эхокардиография

ВВЕДЕНИЕ

В пособии представлены материалы, цель которых – оказать помощь в освоении одной из фундаментальных медицинских дисциплин - патологической анатомией, познакомить обучающихся с методами морфологической диагностики болезней, используемыми в научных и практических исследованиях, правильно оценивать результаты исследования операционного, биопсийного и секционного материала. Морфологические методы диагностики широко освещены в различных специальных пособиях, руководствах, однако количество информации, язык и форма изложения материала в них представлены изолированно, сложно. В имеющихся учебниках данный материал освещен недостаточно. Литература для студентов, впервые сталкивающихся с подобной формой медицинской деятельности, дающей обобщенный взгляд на современные достижения морфологической диагностики, встречается редко или в чем-то устарела. Учебное пособие, подготовленное авторским коллективом, должно восполнить этот пробел, служить дополнением к учебнику по патологической анатомии, отражающим современные достижения морфологической диагностики. Пособие содержит основной теоретически материал, современные классификации, список рекомендуемой основной и дополнительной литературы, а также вопросы, тестовые задания и ситуационные задачи для самоконтроля.

Учебно-методическое пособие подготовлено на основании рабочих программ (2016г.), действующих учебных планов (27.06.2017г.) и в соответствии с требованиями ФГОС ВО, ООП для изучения дисциплин: «Патологическая анатомия, клиническая патологическая анатомия» по специальностям лечебное дело 31.05.01 и педиатрия 31.05.02; «Патологическая анатомия» по специальностям медико-профилактическое дело 32.05.01 и стоматология 31.05.03. и направлено на освоение общепрофессиональных и профессиональных компетенций: ОПК9 (Способность к оценке морфофункциональных, физиологических состояний и патологических процессов в организме человека для решения профессиональных задач), ПК5 (Готовность к сбору и анализу результатов па-

тологоанатомических исследований в целях распознавания состояния или установления факта наличия или отсутствия заболевания), ПК6 (Способность к определению у пациентов основных патологических состояний, симптомов, синдромов заболеваний, нозологических форм в соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем – X пересмотр, принятой 43-ей Всемирной Ассамблеей Здравоохранения, г. Женева, 1989 г.).

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ. КЛАССИФИКАЦИЯ

Современный - относящийся к настоящему времени, существующий сейчас

Морфологические методы - методы объективных исследований клинических материалов

Цели, стоящие перед патологической анатомией (патоморфологией, ПА), как наукой, так и отраслью практического здравоохранения, станут достижимыми, если она будет обладать методами, соответствующими поставленным перед ней задачам. Поэтому ПА на протяжении многих лет разрабатывала и совершенствовала свои методы. На современном этапе развития потенциальные возможности ПА существенно расширились благодаря новым методам исследования. Это дает возможность диагностировать патологические процессы как на макро- так и на микроскопическом уровнях, получать новейшие научные факты, выявлять структурные основы патологических процессов на различных уровнях организации живой материи.

Отличительной особенностью морфологических методов исследования в медицине является непосредственное восприятие изучаемого объекта, описание со сбором эмпирической информации о нем, получение его характеристики, прежде всего визуальной, как результата наблюдения. В отличие от этого, методы исследования, широко используемые в патологической физиологии и в других разделах клинической медицины, изучают свойства объекта, регистрируя характер вторичных изменений в среде, вызванных самим существованием объекта, не воспринимая его непосредственно.

Морфологические методы, как научные методы, включают три периода:

1. Эмпирический период - сбор первичной информации об объекте исследования, в первую очередь визуальной, далее тактильной, обонятельной, реже слуховой (размеры, цвет, характер поверхности, консистенция, вес, запах, изда-

ваемые звуки изменённой ткани). В основе эмпирического периода морфологических методов исследования лежит **дескриптивный** метод - метод описания, фиксации воспринимаемой информации с помощью вербальных символов (средств языка, чисел). Адекватное описание (качественное и количественное) патологических процессов является своеобразным информационным отображением объекта исследования, поэтому оно должно быть точным и полным. Морфологический метод описания макро- и микрообъектов применяется в своей работе патологоанатомами и судебно-медицинскими экспертами, а также врачами многих других специальностей. Врачи клинико-лабораторной диагностики неотъемлемо используют морфологические методы диагностики в своей работе. Так метод описания макрообъектов используется любым врачом во время осмотра больного при выявлении изменений доступных зрению тканей (кожа, видимые слизистые оболочки). Во время оперативных вмешательств для определения тактики хирурга ориентируются по внешним изменениям внутренних органов, в том числе при их удалении, и отображают эти сведения в истории болезни (протоколе операции). В тоже время в арсенал клинической диагностики стремительно вошли прижизненные визуализирующие, по сути своей морфологические методы исследования – рентгенологическая (обзорная, контрастная, ангиография, компьютерная томография), ультразвуковая (УЗИ, ЭхоКГ, УЗДГ), эндоскопическая (ФЭГДС, ФКС, гистероскопия, бронхоскопия, артроскопия, торако- и лапароскопии) диагностика, ядерномагнитнорезонансная томография, сцинтиграфия и другие. Тем самым они намного расширили диагностическую базу, максимально приблизили лечащего врача к пораженному органу, ткани – субстрату болезни. Эти методы также используются и патологоанатомами как частично (получение дополнительной информации без предварительного разрушения целостности тела, органа, ткани в научных и практических целях), так и в качестве самостоятельной процедуры – появившаяся в последнее время посмертная контрастная компьютерная томография (виртопсия)– взамен классической аутопсии.

2. Теоретический период - осознание полученной эмпирической информации и ее систематизация. Эффективность этого периода во многом зависит от

полноты и широты теоретических знаний и практических навыков исследователя, поскольку восприятия эмпирической информации напрямую соответствует принципу: «Мы видим (распознаем) то, что знаем».

3. Период практического исполнения - реализация результатов исследования в клинической практике (клинико-морфологический анализ). Результаты морфологического исследования в медицине ложатся в основу диагноза, обосновывают применяемую тактику ведения больного, позволяют провести экспертизу качества диагностики и лечения, что и определяет важное практическое значение метода.

Методические возможности современной морфологии позволяют удовлетворить стремление патологоанатома увеличить точность морфологического исследования патологических процессов, а следовательно способствует более адекватной функциональной интерпретации структурных изменений.

Материал для исследования ПА получает при вскрытии трупов, у живого человека при хирургических операциях, проведении биопсии, выделении последа у родильниц и при проведении экспериментов. В процессе каждого из этих клинико-диагностических изысканий используется множество методик, которые в совокупности позволяют наблюдать структурные основы болезни на разных уровнях:

1. Организменный уровень. При этом исследованию подвергается организм в целом во взаимосвязи всех его органов и систем. Именно с этого уровня начинается обследование больного - в клиниках, трупа - в моргах;

2. Системный уровень. Объектом исследования является какая-либо система органов и тканей (сердечно-сосудистая система и др.);

3. Органный уровень. Макроскопически изучается отдельный орган в целом невооруженным глазом;

4. Тканевый и клеточный уровни. При этом уже с помощью светового микроскопа определяют изменения тканей, клеток и межклеточного вещества;

5. Субклеточный уровень. На этом уровне прибегают к использованию электронного микроскопа, который позволяет наблюдать изменения ультраструктуры клеток и межклеточного вещества. Собственно патологические

процессы субклеточного уровня в большинстве случаев являются первыми структурными проявлениями заболеваний;

6. Молекулярный уровень организации живой ткани достигается при комплексном использовании таких методов исследований, как электронной микроскопии, цитохимии, радиоавтографии, иммуногистохимии и др., и по сути позволяет достичь грани перехода патологической анатомии в структурную биохимию.

Такой подход в исследовании является достижением современной ПА и позволяет проследить неразрывное диалектическое единство структуры и функции, как в условиях физиологии, так и патологии.

В настоящее время в ПА выполняются макроморфологические и микроскопические методы исследования с использованием различных способов визуализации (светооптическая, электронномикроскопическая и др.) и идентификации (окраска, импрегнация, гистохимическая реакция, иммуногистохимическая реакция, радиоактивные метки, ПЦР, гибридизация *in situ* и др.) объектов исследования (цитологические, гистологические, культуры тканей и др.). В тоже время оказалась эффективной и полезной тенденция к сочетанию ряда изолированных методов морфологического исследования в комплексные: электронномикроскопическая иммуногистохимия, электронно-микроскопическая авторадиография и др., что значительно расширило возможности исследователя в познании структурно-функциональной сущности болезни.

Наряду с качественным описанием исследуемых процессов и явлений современная ПА дает возможность количественной оценки с использованием методов морфометрического анализа. Морфометрия использует в своих целях достижения математики и электронной техники для подтверждения достоверности результатов и правоты толкования выявленных тенденций и закономерностей. *«Наука начинается с тех пор, как начинают измерять. Точная наука немислима без меры.» (Д. И. Менделеев).*

Помимо этого «... с помощью современных методов исследования патологоанатом может обнаружить не только морфологические изменения, свойственные развернутой картине того или иного заболевания, но и начальные из-

менения при болезнях, клинические проявления которых еще отсутствуют в силу состоятельности компенсаторно-приспособительных процессов» (Д.С. Саркисов). Следовательно, начальные структурные изменения болезней развиваются раньше, чем их первые клинические проявления. В тоже время любое заболевание зарождается с изменения субклеточных структур, и распознавание его ранних морфологических проявлений на органном и тканевом уровнях бывает трудно, так как они имеют незначительный и неспецифический характер.

Таким образом, ПА, располагая многообразием современных технических и методических возможностей (табл.1.), призвана и способна решать задачи стоящие как перед практической клинической диагностикой заболеваний, так и перед научно-исследовательской деятельностью. В тоже время корректное применение современных методов морфологического исследования в клинических и экспериментальных исследованиях позволяет достичь объективности, полноты и достоверности получаемых результатов.

Таблица 1

Классификация методов морфологической диагностики

№	Принцип/параметр	Разновидности
1	Материал исследования	1. Прижизненный (операционный, биопсийный, последы) материал. 2. Посмертный (трупный) материал 3. Экспериментальный материал.
2	Объект исследования	1. Макроморфологические объекты (тело, части тела, органы части органа, кусочки тканей) 2. Микроскопические объекты (гисто- и цитологические препараты, культуры клеток).
3	Уровни исследования	1. Организменный. 2. Системный 3. Органный 4. Тканевой 5. Клеточный 6. Субклеточный. 7. Молекулярный.
4	Способ визуализации	1. Макроморфологический 2. Микроскопический (светооптический, электронномикроскопический)
5	Способ идентификации	2. Базовая гисто-, цитологическая окраска 3. Гистохимическая реакция 4. Импрегнация 5. Флюоресценция 6. Иммуногистохимическая реакция 7. Радиоактивная метка. 8. Методы молекулярной биологии

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И ОБЪЕКТЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал, применяемый при морфологических исследованиях принято разделять на три группы:

- прижизненный материал (материал, полученный от живых людей (органы, ткани, клетки, продукты секреции и экскреции, жидкости);
- трупный (посмертный) материал;
- экспериментальный материал.

2.1. ПРИЖИЗНЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Особое значение в современной практической и теоретической медицине в настоящее время имеет прижизненная морфологическая диагностика, которая базируется на комплексном изучении операционного, биопсийного материалов, последов и самопроизвольно отторгающихся у больных фрагментов тканей. В сумме они составляют подавляющую (до 80%) часть работы современного патологоанатома. Постоянно возрастающий объем прижизненной морфологической диагностики обусловлена увеличением хирургической активности, а также совершенствованием возможностей врачей хирургического профиля: хирургов, ЛОР-врачей, урологов, проктологов, офтальмологов, гинекологов и др. Разумеется, что диагностическая роль и ответственность патологоанатома в этом случае велики ведь его заключение нередко ложится в основу клинического диагноза. При этом достоверность и полнота результатов морфологического исследования во многом зависит от соблюдения правил получения исследуемого материала (забора, фиксации, маркировки, своевременной доставки, полноты информации в сопроводительном документе о клинической картине болезни). Поэтому для патологоанатома незыблемо правило: *«Нельзя приниматься к исследованию, не обладая полной и адекватной информацией о поступившем ма-*

териале». Последняя должна включать в себя помимо паспортных данных больного развернутый клинический диагноз с указанием сведений о локализации, продолжительности и других особенностях течения патологического процесса (направление на прижизненное патологоанатомическое исследование биопсийного (операционного) материала (приложение 2,3 к приказу №179 МЗ РФ от 24.03.2016г) (см.прил. 1.). Важнейшим этапом подготовки материала к передаче в патологоанатомическое отделение является его маркировка и фиксация. В тоже время «идеальной» считают ситуацию, когда нефиксированные материал немедленно передают в морфологическую лабораторию (например, в вакуумной упаковке), что обеспечивает патологоанатому возможность использовать в диагностике весь спектр морфологических, иммуногистохимических, цитогенетических и других методов. При отсутствии такой возможности, для предотвращения аутолиза (разрушения) тканей объекты для прижизненной морфологической диагностики должны быть подвергнуты специальной обработке (фиксации).

Технологическая цепочка при поступлении прижизненного материала в морфологическую лабораторию включает его прием и регистрацию; макроморфологическое описание и вырезку; фиксацию доставленных нефиксированных материалов; приготовление препаратов; собственно морфологическую диагностику; выдачу заключений и сохранение материалов в архиве.

Заключение по прижизненной морфологической диагностике, отраженное в протоколе, может носить окончательный (однозначный, конкретное заболевание), ориентировочный (необходима дифференциальная диагностика ограниченного круга заболеваний) или описательный (только описание структуры и общепатологического процесса) характер.

2.1.1. Операционный материал

Органы (или их части), ткани, полученные при различных вариантах оперативного вмешательства (рис.1.). Следует отметить, что все ткани, извлечённые из организма при любом оперативном вмешательстве, подлежат обязатель-

ному морфологическому исследованию. Морфологическое исследование операционного материала проводят для уточнения клинического диагноза, обоснованности, контроля качества и объема хирургического вмешательства и определения дальнейшей тактики ведения пациента.

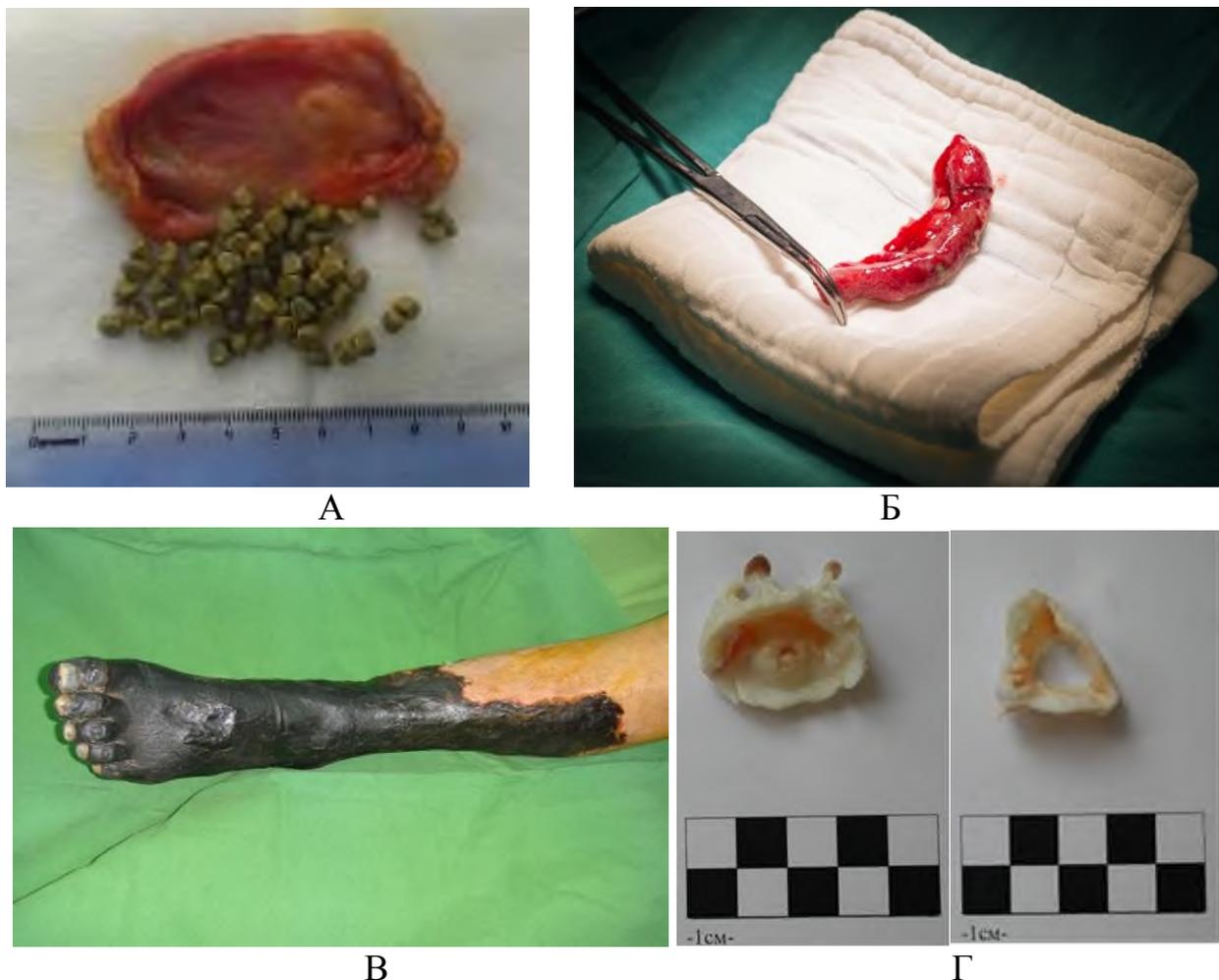


Рис. 1. Операционный материал: А – желчный пузырь при желчнокаменной болезни [konsurgery.ru]; Б – червеобразный отросток слепой кишки при аппендиците [stomach-info.ru]; В – ампутированная нижняя конечность при гангрене [nursingfile.com]; Г – створки аортального и митрального клапанов сердца при ревматических пороках.

2.1.2. Биопсийный материал

Биопсия (biopsia; греч. bio– жизнь, orsis - зрение, зрительное восприятие, отличать от *випсия*) - инвазивный вид морфологического исследования прижизненно иссеченных или изъятых другим способом взвесей клеток, тканей и частей органов в минимально достаточном объеме для целей первичной диа-

гностики, а также отслеживания динамики патологического процесса в условиях применения терапевтических и хирургических лечебных мероприятий.

Биопсию применяют в лечебных учреждениях, как стационарах, так и поликлиниках. Широкое применение получили, например, инцизионные биопсии кожи и шейки матки, пункционные биопсии подкожно расположенных патологических образований, аспирационные биопсии содержимого различных полостей и полостных органов (верхнечелюстных (гайморовых) пазух и полости матки). Биопсийный материал изучается в основном гистологически и цитологически, однако может быть получен и для электронно-микроскопического изучения.

Биопсия должна проводиться под обезболиванием с соблюдением правил асептики. Ткань, взятая для биопсии, должна содержать патологический субстрат и прилегающую к нему морфологическую структуру для исключения инвазивного роста новообразования, наличия других патологических процессов. В зависимости от способа получения диагностического материала биопсия может быть инцизионной, пункционной, аспирационной, эндоскопической, трепанационной, кюретаж-биопсей (соскоб) и другой.

В практической медицине широко распространена инцизионная (открытая) биопсия (рис.2.). Часть органа или целый орган иссекают оперативным путём. Если патологический очаг удален полностью, то говорят о тотальной (экцизионной) биопсии. Не следует брать на исследование только участки некроза и кровоизлияний. Размеры кусочка должны быть достаточными для проведения исследования, в среднем до 0,5 см в наибольшем измерении.

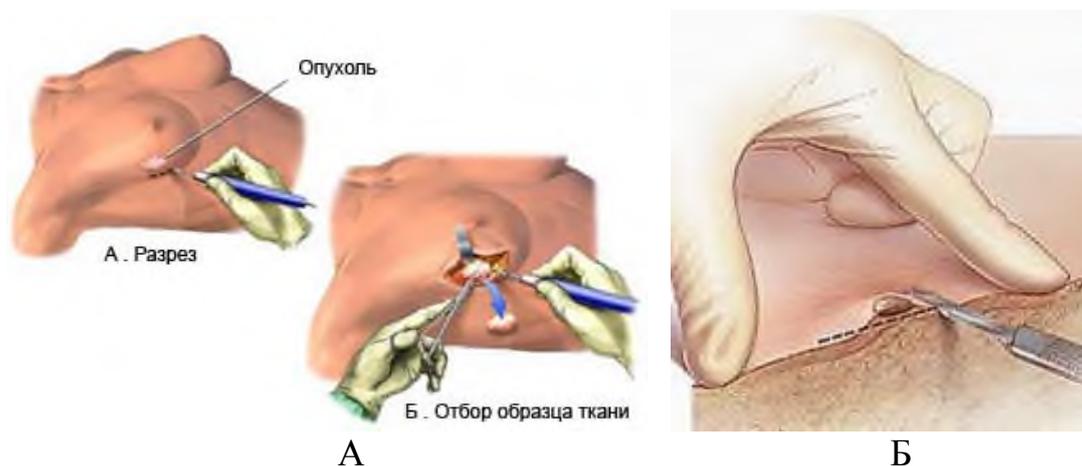


Рис. 2. Инцизионная биопсия: А – молочной железы [krasivayagrud.ru]; Б – кожи [syl.ru].

В основе пункционной биопсии лежит получение с помощью специальных игл, троакаров из органа столбика ткани. Для большей эффективности данную манипуляцию проводят под УЗИ-, МРТ-контролем (рис. 3).

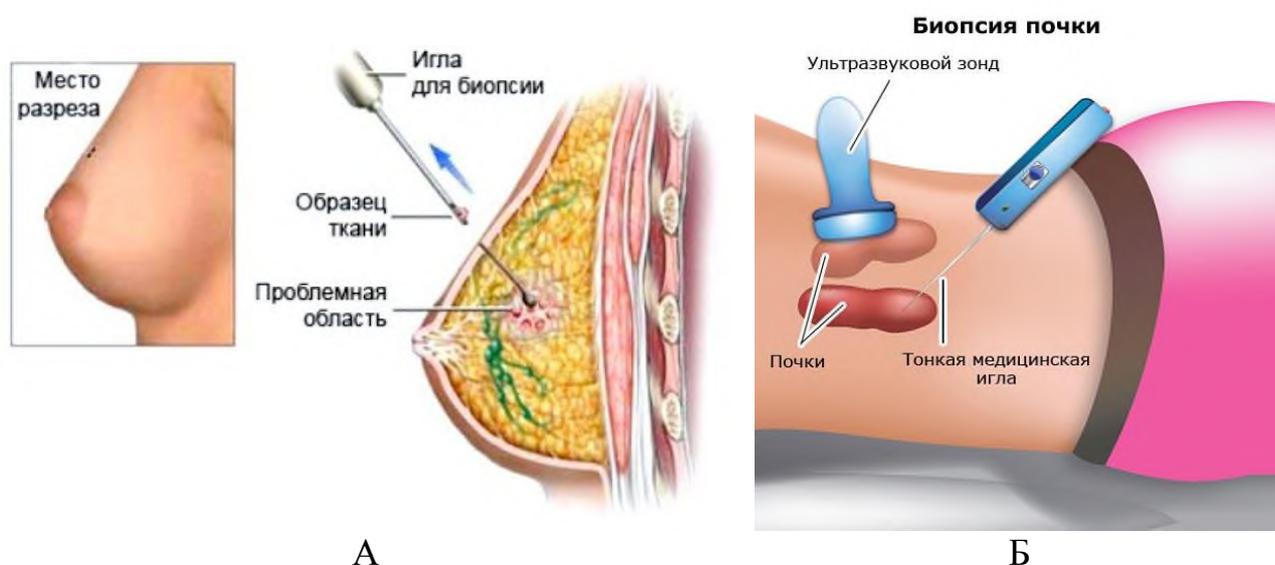


Рис. 3. Пункционная биопсия: А – молочной железы [med-atlas.ru]; Б – почки [okardio.com].

Трепанобиопсия является разновидностью пункционной биопсии. При этом ткань костей или костного мозга получают с помощью специального инструмента - трепана.

Развитие эндоскопических методов диагностики и лечения привело к увеличению количества эндоскопических биопсий, когда материал получают при проведении эндоскопических манипуляций (рис.4.). При этом виде биопсии

получение материала возможно практически из любых отделов тела. Наибольшее распространение эндоскопическая биопсия получила при заболеваниях органов желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей – желудка и кишечника, трахеи и бронхов. Возможный объём, полученного с помощью эндоскопического манипулятора (гастро-, бронхоскопа), материала очень мал, поэтому достоверная верификация патологического процесса обеспечивается увеличением количества взятых фрагментов-биоптатов до 4-6 штук из одной локализации.

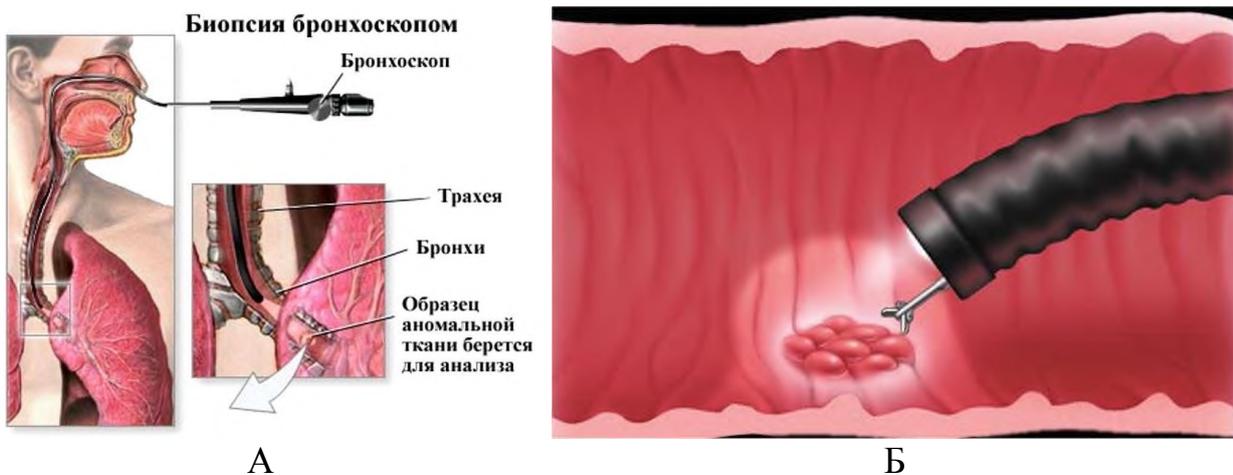


Рис. 4. Эндоскопические биопсии: А – бронха; Б – желудка [oncomedic.org].

Аспирационную биопсию применяют для исследования жидкого содержимого полых органов или аспирата, полученного из полостей тела с помощью иглы-шприца или специальных инструментов (рис. 5.). С этой же целью изучают диализный раствор из бронхов, желудка, плевральной или брюшной полостей, из полости матки, а также толщи паренхиматозных органов. Полученный материал подвергают в основном цитологическому исследованию. Кроме этого к цитологическому материалу относят мазки, смывы, соскобы, отпечатки, центрифугаты и др.



Рис. 5. Аспирационная биопсия: А – амниоцентез [gebelikmerkezi.com]; Б – эндометрия [medworker.ru].

В зависимости от срочности и неотложности исследования биопсия бывает плановой и срочной. При первой заключение специалиста по результатам исследования выдается не позднее, чем через 4 рабочих дня после поступления биоптата, если материал подвергается планомерной полной стандартной обработке. При проведении дополнительной обработки и методов исследования время может быть увеличено. В ряде случаев в ходе оперативного вмешательства возникает необходимость определить характер патологического процесса. В этих случаях выполняют интраоперационную *срочную* биопсию. Срочное гистологическое исследование выполняется в течение 20 мин после доставки кусочка иссеченной ткани из операционной. Срочную биопсию проводят для установления природы заболевания, определения объема оперативного вмешательства. Особенно часто этот прием используют при злокачественных опухолях. Для этого используют ускоренные методики фиксации (замораживание), изготовления и окраски препаратов. Следует отметить, что срочная биопсия по своей диагностической точности уступает плановому гистологическому исследованию и в связи с прогрессом предоперационных диагностических мероприятий и возможностей хирургии за настоящее время теряет свою частоту и актуальность.

2.1.3. Послед

Послед - временный орган в период беременности, связывающий организм матери с плодом (рис. 6.). Он состоит из пуповины, околоплодных оболочек и плаценты. При морфологическом исследовании последа диагностируются патологические процессы, связанные с болезнями плода и матери. Обязательно исследование последа во всех случаях мертворождения, при тяжелом состоянии новорожденных и их смерти.

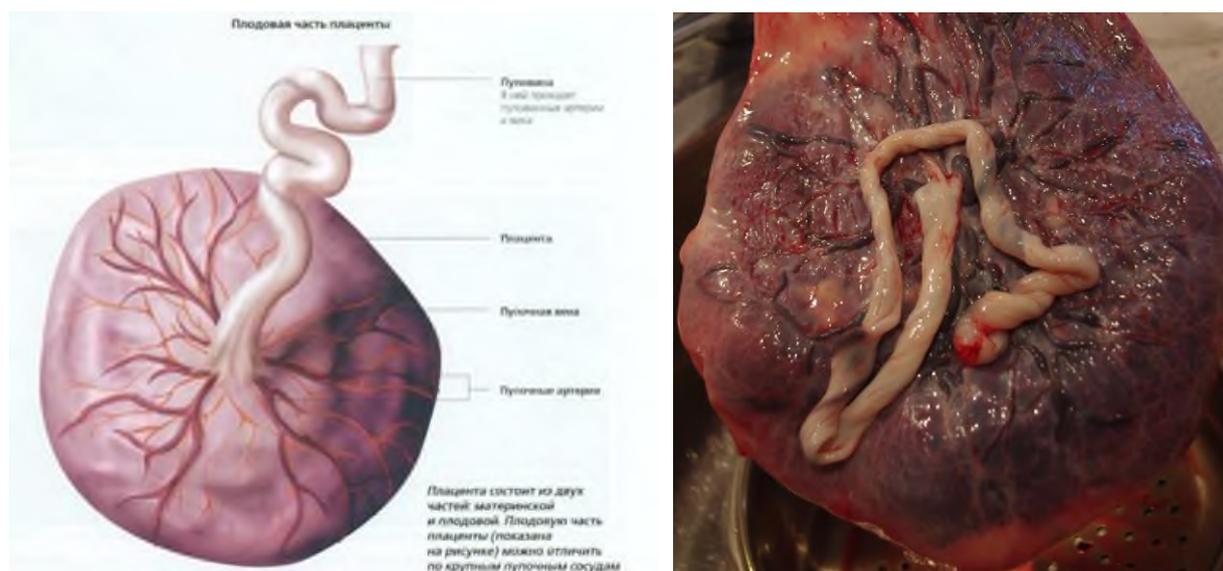


Рис. 7. Послед: плацента, пуповина, оболочки плода [edem-style.ru].

Таким образом, изучение прижизненного морфологического материала (биоптатов, операционного материала и последов) делает врача-патологоанатома непосредственным участником клинической диагностики, ответственным за судьбу больного. Необходимо еще раз подчеркнуть, что только совместная и согласованная работа клинициста и патологоанатома способствует точной и своевременной диагностике многих заболеваний. Прижизненная морфологическая диагностика требует от патологоанатома не только знания патологической цито- и гистологии, но и клинического мышления, а от клинициста - знаний основ морфологии и понимания возможностей микроскопии, умения правильно оценить (интерпретировать) заключения по биопсийному и операционному материалам.

2.2. ПОСМЕРТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ. ТРУПНЫЙ МАТЕРИАЛ

*Hic locus ubi mortui docent vivos (лат.) -
Здесь мертвые учат живых*

Посмертные исследования проводят на трупном материале. Традиционно у лиц, проходивших обследование и лечение в медицинских учреждениях и умерших от болезней, проводят изучение органов и тканей в ходе патологоанатомических вскрытий (*аутопсий*, некропсий, секций, обдукций) и дальнейших патологоанатомических исследований. Правильнее и точнее называть эту процедуру некропсией (от греч. nekros – смерть и orsis – осмотр), а не аутопсией (autos – сам). Однако термин «аутопсия» более распространен; он позволяет отличать вскрытие тела умершего человека от вскрытия тела живого человека («витопсия») или животных.

Патологоанатомические вскрытия трупов производит в патологоанатомическом отделении больницы врач-патологоанатом (прозектор). Судебно-медицинские эксперты расследуют смертельные случаи, наступившие не от болезней, а в результате причин насильственного характера (преступлений, катастроф, несчастных случаев и другое) или по неясным причинам.

Аутопсия - самый старый метод морфологического исследования (рис. 7.). С давних времён патологоанатомическое вскрытие применяли для определения причин болезней, характерных для них изменений органов и тканей, причин, приводящих больного к смерти. Тщательное исследование всех изменений органов и систем умершего во время вскрытия позволяют составить наиболее полное и объективное представление о тех заболеваниях, которыми страдал больной при жизни. Только аутопсия даже на современном этапе позволяет обоснованно говорить о том, что представляет собой болезнь, какой морфологический субстрат соответствует нарушениям функций и клиническим проявлениям болезни в ее динамике, при выздоровлении, инвалидизации или смерти больного. Также именно во время вскрытия обнаруживаются факты (изменения



Рис. 7. Картина художника Рембрандта "Урок анатомии доктора Тульпа."

органов и тканей), по которым можно судить о правильности диагностики, обоснованности и эффективности лечебных мероприятий, об изменчивости на фоне лечения болезней, а также о патологии диагностики и лечения (врачебные ошибки и ятрогении). Нередко лишь на вскрытии возникают подозрения на то или иное заболевание, что позволяет провести соответствующие исследования совместно с врачами других специальностей (рис. 8).



Рис. 8. Патологоанатомическое вскрытие в современных условиях [interesnoe.me].

Трупный материал исследуют на макроморфологическом и микроскопическом уровнях. Реже используют рентгенологические, микробиологические и биохимические методы и др. В патологоанатомическое отделение вместе с телом умершего доставляют его историю болезни и всю относящуюся к ней медицинскую документацию. Перед аутопсией патологоанатом обязан тщательно изучить историю болезни, определить полноту прижизненного исследования органов и систем, ясность клинического диагноза, исключая насильственную смерть, ятрогению, а затем пригласить на проведение аутопсии лечащих и консультирующих врачей. Последние во время вскрытия имеют возможность удостовериться в правильности своих предположений о процессах и изменениях, которые происходили в организме больного при жизни. Нередко разность интерпретации находок между клиницистами и патологоанатомом во время вскрытия может явиться причиной профессиональных споров.

По результатам аутопсии врач-патологоанатом заполняет протокол вскрытия, составляет предварительный патологоанатомический диагноз и на основании этого в медицинском свидетельстве о смерти указывает ее причины (см. прил. 2).

Аутопсия обязательно предусматривает формулировку патологоанатомического диагноза, который строится по тем же принципам, что и клинический диагноз. Однако если в первом случае превалирует структурное (морфологическое) начало, то во втором - клинико-функциональное направление. Построение диагноза в том и другом случаях основывается на знании клиники заболевания, на результатах функциональных и морфологических методов исследования в динамике. В полноте собранных клинико-морфологических сведений лежит точность постановки диагноза. Всё это позволяет сопоставлять заключительный клинический и патологоанатомический диагнозы, констатировать их совпадение или расхождение. При расхождении диагнозов необходимо оценить его прогностическое значение в данном конкретном случае и вместе с клиницистами искать его причину. На сегодняшний день выработаны критерии оценки расхождений клинического и патологоанатомического диагнозов (I, II и III ка-

тегории), а также классификация причин расхождений (объективного и субъективного характера). Тем самым вскрытие трупов умерших после болезни служит целям повышения квалификации клинических врачей и экспертизы качества лечебно-диагностической деятельности медицинского учреждения (хотя контроль этот сложен и осуществляется не только патологоанатомами). Также значение посмертной диагностики патологоанатома заключается в накоплении статистических и научно-практических данных о болезнях и патологических процессах, необходимых для анализа причин и характера смертности населения. В связи с этим вскрытие трупа может рассматриваться как завершающий этап диагностики, необходимый не только клиницисту и патологоанатому, но и медицинскому статисту и организатору здравоохранения. Оно не теряет своего значения и в современных условиях при широком использовании прижизненной диагностики заболеваний. Ведь только вскрытие трупа позволяет увидеть и оценить всю историю болезни человека от начала и до конца, вместе с клиницистами проанализировать все этапы лечения больного, суммировать как положительный, так и отрицательный опыт врачей и обсудить все аспекты лечения и ошибок на клиничко-патологоанатомических конференциях. В тоже время аутопсия является базой научных исследований, преподавания фундаментальных и прикладных медицинских дисциплин, школой врача любой специальности. Анализ результатов вскрытий играет важную роль в решении ряда крупных научно-практических проблем, например проблемы изменчивости или патоморфоза.

Последовательный анализ летальных исходов, приемы и методы, используемые на каждом из его этапов, определяются как общими задачами исследования, так и конкретными условиями и целями данного этапа. Достоверность конечной информации, безусловно, зависит от качества проведения всех этапов исследования, однако первоначальному – собственно вскрытию, принадлежит бесспорный приоритет. От качества проведения вскрытия трупа зависит весь последующий анализ, более того сама возможность его проведения. Вскрытие является неповторимым этапом исследования, поскольку при нем нарушается

анатомическая целостность, картина, созданная патологическим процессом или хирургическим вмешательством. В этой связи аутопсия должна проводиться с максимальной тщательностью и полнотой, как и фиксирование всех обнаруженных изменений в документации. Патологоанатом в совершенстве должен владеть всеми техническими приемами вскрытия трупа. Обычно патологоанатом избирает для себя определенный метод вскрытия, который, по его мнению, позволяет ему быстрее, точнее и демонстративнее выявлять патологические изменения, их распространенность, пространственные взаимоотношения. Определенная степень стандартизации проведения вскрытий и последовательности технических приемов позволяет патологоанатому провести исследование на профессиональном уровне, избегая пропусков и недочетов. Аутопсия включает наружный осмотр и исследование внутренних органов после вскрытия полостей тела и их извлечения. Наружный осмотр умершего может помочь предположить то или иное заболевание и значительно облегчить построение патологоанатомического заключения.

Существует несколько методов вскрытия трупа, которые использует патологоанатом. Они применимы в разных ситуациях и условиях, от этого во многом зависят результаты аутопсии. **Рудольф Вирхов** (рис. 9) одним из первых предложил специальный метод вскрытия, при котором органы из тела трупа извлекаются по отдельности. При этом, однако, нарушаются анатомические



связи между органами, что в ряде случаев может привести к ошибке.

Рис. 9. РУДОЛЬФ ЛЮДВИГ КАРЛ ВИРХОВ (1821-1902 гг.). *Немецкий учёный и политический деятель второй половины XIX столетия, врач, патологоанатом, гистолог, физиолог, один из основоположников клеточной теории в биологии и медицине, основоположник теории клеточной патологии в медицине; был известен также как археолог, антрополог и палеонтолог.*



Рис. 10. АБРИКОСОВ АЛЕКСЕЙ ИВАНОВИЧ (1875-1955 гг.). *Российский и советский патологоанатом, академик Академии наук СССР, Герой Социалистического Труда, профессор 1-го Московского медицинского института.*



Рис. 11. ШОР ГЕОРГИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ (1872-1948 гг.). *Российский и советский патолог-кондиционалист, танатолог. Заслуженный деятель науки, профессор, второй заведующий кафедрой патологической анатомии СПбГМУ.*

Чуть позднее **Алексей Иванович Абрикосов** (рис. 10) предложил вести вскрытие, следуя топографическому расположению органов, которые при этом делятся на пять систем и извлекаются в несколько приёмов. У этого метода есть свои недостатки, так как он приводит к расчленению анатомо-физиологических систем, опухоли, оперированные органы на фрагменты.

Наибольшее распространение в практике получил способ **Георгия Владимировича Шора** (рис. 11), при котором органы выделяют не поодиночке, а целым органокомплексом. При полной эвисцерации сохраняются естественные связи между органами, а также изменения в их топографии, возникшие в результате операции, определяются пределы прорастания опухоли и т.п. В тоже время использование данного метода вскрытия не препятствует применению специальных способов вскрытия систем организма по отдельности. Иногда можно прибегнуть к осмотру и вскрытию органов «на месте» без извлечения их из трупа. Этот метод используется при патологоанатоми-

ческом исследовании трупов лиц, умерших от инфекционных заболеваний и особо опасных инфекций и имеет в связи с этим некоторые преимущества, так при разрезе органов инфицированная жидкость стекает в полости трупа и тем самым уменьшается загрязнение стола. Основным недостатком является ограничение возможностей макроморфологического исследования. Наряду с классическим вскрытием трупа при патологоанатомическом исследовании возможно применение и "щадящей" секции органов, в том числе с использованием малоинвазивной технологии. В исключительных случаях, учитывая просьбу родственников, в прозектурах прибегают к неполному (частичному) патологоанатомическому вскрытию (например, без исследования головного мозга и других). После принятия решения о "щадящей" секции органов патологоанатомическое исследование может осуществляться по Шору (полная эвисцерация) без разрезов груди и рассечения ребер, по методу Автандилова или Самсонова, а также используя модифицированный вариант неполного вскрытия (см. раздел 5.3). Более точные сведения об особенностях вскрытия трупов различными методами описаны в специальной литературе.

Внедрение современных информационных технологии в медицину позволило проводить «виртопсию», или виртуальную аутопсию, не требующую вскрытия трупа, с помощью нового робота *Virtobota* (г. Берн, Германия). Процедура «виртопсии» осуществляется путем построения многослойного трехмерного изображения тела мертвого человека с помощью оптических сканеров (снаружи) и магнитно-резонансной томографии (внутри) без рассечения тканей (цифровая мультипластинная томография тела). В результате исследователи получают возможность изучить труп как снаружи, так и внутри и со всех сторон. Используя результаты виртопсии можно прицельно с помощью пункции взять образец интересующей ткани для дополнительного микроскопического исследования. Подобная техника позволяет сохранять результаты посмертного исследования «в цифре» (рис.12.). Однако практика показала, что у данного



Рис. 12. Робот для проведения виртопсии [popsci.com].

метода имеется ряд ограничений, таких как узкая разрешающая способность, высокая трудоемкость, огромный массив электронной информации, необходимость привлечения специалистов смежных профилей (рентгенологов, инженеров) и т.д. Поэтому данный метод имеет свои строгие показания и может быть использован только как дополнение к классической аутопсии, а не как полная замена ее.

2.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Патологоанатом во время исследования ткани, взятых при жизни или после смерти больного, фиксирует изменения, которые наблюдались в момент изъятия ткани. Что имело место до этого и могло возникнуть после - остается до конца неизвестным. В этих условиях возрастает значение исследований экспериментального материала, когда ответы на сложные вопросы возникновения и законов течения патологических процессов и болезней вместе ищут и клиницист, и патологоанатом (рис. 13).



Рис. 13. Препаровка экспериментального животного (крыса) [m.androidmafia.ru].

Эксперимент с достаточным количеством лабораторных животных – это уникальное многоплановое исследование, которое позволяет моделировать и изучать болезни и патологические процессы на любом этапе их развития, дает возможность использовать широкий спектр методов фиксации, применять гисто- и цитохимические методики, электронную микроскопию, радиоавтографию, культуры тканей, с его помощью разрабатываются и испытываются новые методы лечения.

С другой стороны морфологическое исследование является неотъемлемой составной частью экспериментально-клинической работы. В настоящее время морфологическими исследованиями широко пользуются, несмотря на их растущую дороговизну. При этом их проводят как в организме живого животного (*in vivo*), так и *in vitro* (в культурах тканей, клеток, взятых от животных, пробах крови и т. д.). Однако для достоверности окончательных научных выводов, морфологические данные, полученные в экспериментальной модели, должны быть строго соотнесены с подобными данными при той же болезни у человека. При работе с лабораторными животными необходимо знать и соблюдать Международные правила гуманного к ним отношения.

2.4. ОБЪЕКТЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Макроморфологическими объектами в патологической анатомии являются тело умершего в целом (труп), его части, системы органов и отдельные органы, которые исследуются во время аутопсии (рис.14). Также исследование и описание макрообъектов (патологически измененные части тела, органы или их фрагменты, кусочки тканей) проводят на первом этапе морфологического анализа прижизненного (операционного, биопсийного, последа) и экспериментального (лабораторные животные) материалов.



Рис. 14. Макропрепараты: А – Инфаркт миокарда, Б – Кровоизлияние в мозг [по Edward C. Rlatt MD, 1999].

В качестве *микроскопических объектов* морфологического исследования в настоящее время используют взятые у живого человека, у трупов человека и лабораторных животных кусочки тканей, группы клеток, отдельные клетки, а также искусственно выращенные или клонированные культуры тканей и клеток. Микроскопическому исследованию они подвергаются в виде препаратов («стекло») и культур тканей и клеток в питательной среде. Препараты в свою очередь могут быть гистологическими (тканевые срезы) и цитологическим (клетки и группы клеток); фиксированными (мертвые, стабильные, постоянные, сухие) и нефикси-

рованными (живые, нативные, влажные); окрашенными (меченые) и неокрашенными.

Важнейшими условиями получения высококачественных гистологических и цитологических препаратов являются: как можно более раннее получение материала, минимальное травмирование ткани и адекватная фиксация. Вышеупомянутые условия будут невыполнимы при развитии аутолиза. Весь технологический цикл, начинающийся забором материала и заканчивающийся получением окрашенных микропрепаратов для обычного светооптического исследования, называют гисто- и цитологической техникой. Классическая гистологическая техника включает в себя ряд важных этапов: вырезка материала, фиксация, обезвоживание и заливка материала, приготовление гистологических срезов и окраска срезов.

Вырезка материала. Оптимальная площадь кусочков для последующей фиксации составляет 1-2 см² при толщине не более 5-7 мм (рис.15). Для кусочков более крупных размеров фиксация может оказаться неполноценной и не предотвратит развития аутолитических изменений в глубоких участках. Однако для проведения специальных исследований существуют способы получения гистологических срезов больших размеров (гистотопографические срезы), например, всего органа (матка, почка) или его значительной части. Кусочки паренхиматозных органов непосредственно после вырезки погружаются в фиксирующий раствор. Кусочки полых органов вырезаются таким образом, чтобы в препарате были видны все слои стенки, и фиксируются в расправленном состоянии. В отношении серозных оболочек, рыхлой соединительной ткани, мозговых оболочек готовят пленчатые препараты: после осторожной препаровки тканевую пленку расправляют на обезжиренном предметном стекле и вместе с ним помещают в фиксирующий раствор.



Рис. 15. Вырезка материала [medioll.ru].

Фиксация материала обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение, предотвращает развитие аутолитических изменений в тканях. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов. Каждый фиксатор имеет свои преимущества и недостатки, поэтому выбор наиболее приемлемого фиксатора зависит от конкретных задач исследования и вида материала. Объем фиксатора должен превышать объем материала в 10-20 раз. Для каждого фиксатора существует установленное время фиксации. Различают фиксаторы простые (формалин, этанол, ацетон, сулема) и сложные (жидкость Боуэна, Карнуа, Ценкера и другие). Скорость фиксации можно увеличить путем повышения температуры фиксатора или при помещении в термостат, микроволновую печь (при комнатной температуре время фиксации составляет 1-2 суток, при 37°C оно сокращается до 15-17 ч.). После фиксации материал тщательно промывается в проточной воде для удаления остатков фиксирующего раствора. *Обезвоживание* материала наиболее часто осуществляется с помощью батареи спиртов восходящей крепости. Также можно использовать ацетон, ксилол, глицерин и др.

Заливка. Для получения тонких гистологических срезов необходимо фиксированный и промытый материал залить в плотную среду (блок-кусочек материала в заливочной среде различной формы), предвари-

тельно пропитав ею кусочки тканей, что облегчит в дальнейшем резку. Заливочные среды подразделяются на растворимые в органических растворителях (парафин, целлоидин) и водорастворимые (желатин, полиэферы и др.). Чаще всего используется заливка в смесь парафина и воска (рис.16.).

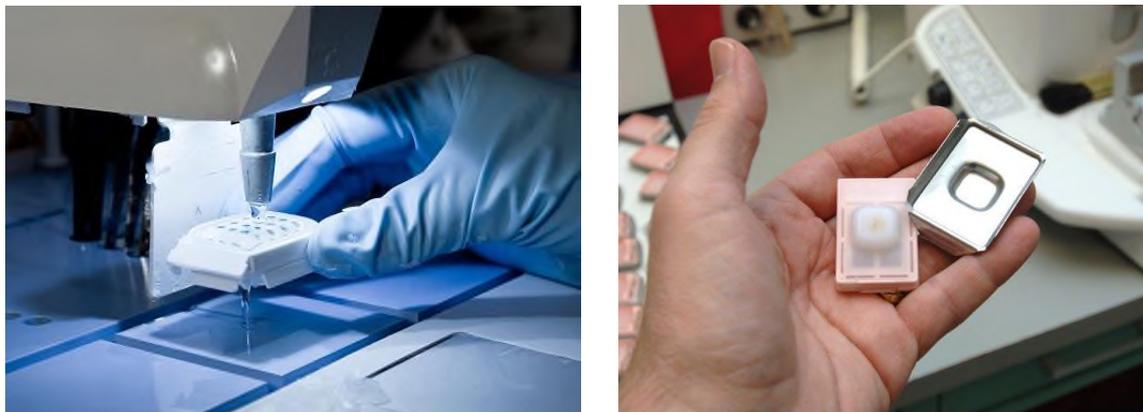


Рис. 16. Заливка материала [optecgroup.com].

Приготовление срезов осуществляется путем резки блока при помощи специального устройства – микротом (санные, ротационные), который позволяет получать серийные срезы толщиной 2-15 мкм, пригодные для окрашивания и микроскопии (рис.17.). Кроме этого, резке может подвергаться нативный материал (предварительно химически нефиксированный). В этом случае ткань фиксируется путем заморозки с использованием жидкого азота или углекислого газа («сухой лед»). Применяется такая форма фиксации чаще всего для получения результатов срочной биопсии и для проведения гистохимических исследований. Для этой цели используется криостат, замораживающий микротом и замораживающий столик. Криостат и замораживающий микротом можно применять и в других ситуациях, например, чтобы сохранить спирторастворимые и прочие компоненты ткани, важные для диагностики.

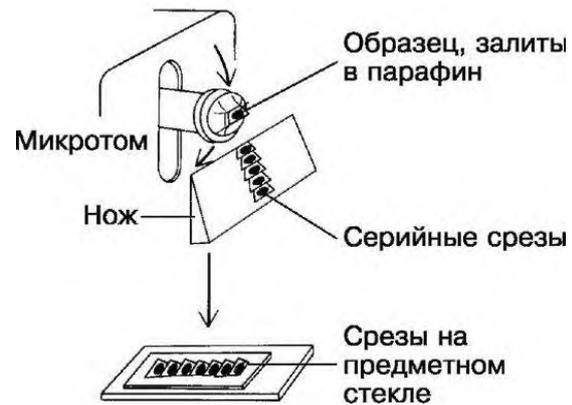


Рис. 17. Приготовление срезов [vmede.org].

Для получения гистологических срезов костной ткани необходимо растворить соли кальция, т.е. декальцинировать материал, сохранив клеточные элементы и органический матрикс кости. Декальцинацию проводят после полной фиксации ткани. В зависимости от используемых реагентов различают кислотную и бескислотную декальцинацию. Для удаления нерастворимого плотного минерального компонента костной ткани при кислотной декальцинации используют азотную, сернистую и другие кислоты. Однако данная методика непригодна для гистохимических и гистоэнзиматических исследований. Бескислотную декальцинацию проводят солями этилендиаминотетрауксусной кислоты.

В тоже время необходимо помнить, что гистологический срез дает только плоскостное изображение истинного объекта. Поэтому соотношение между реальными трехмерными структурами и их срезами, дающими двухмерные изображения, во многом зависит от направления сечения (рис. 18).

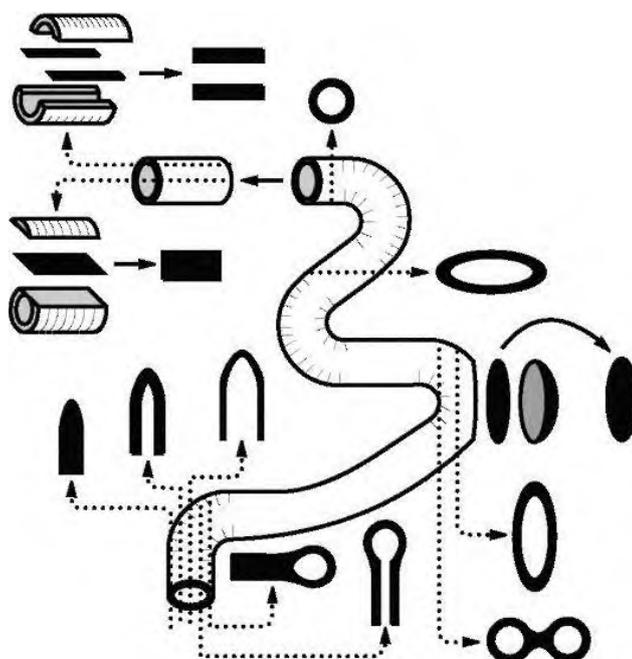


Рис. 18. Направления сечения изогнутой трубчатой структуры и двухмерные изображения плоскости сечения на гистологическом препарате [vmede.org].

Окрашивание срезов включает этап предварительной обработки и собственно окраску (см. раздел 4.1.). Предварительная обработка предполагает депарафинирование срезов, помещенных на предметное стекло с помощью ксилола и спирта. После окраски соответствующими методиками срезы просветляются, заключаются в прозрачную среду (полистирол, глицерин-желатина и др.), накрываются покровным стеклом и высушиваются. После этого гистологические микропрепараты готовы к микроскопии (рис.19.).

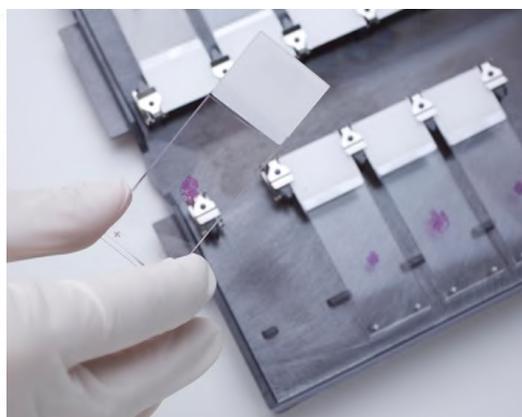
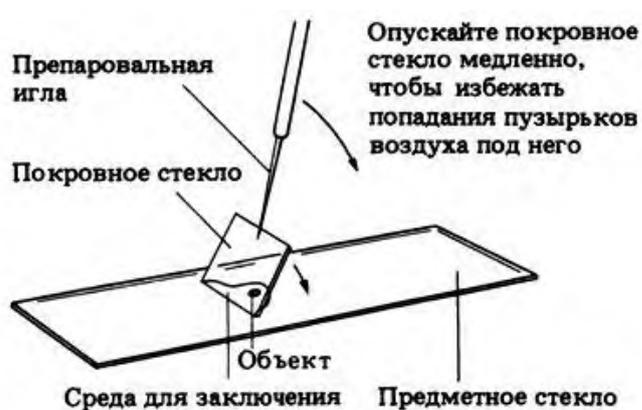


Рис. 19. Готовые микропрепараты [istockphoto.com]

Главной задачей подготовки ткани к проведению *гисто- и цитохимической реакции* является сохранение исследуемых веществ в тканях и клетках, чтобы можно было судить об их прижизненном состоянии. При этом необходимо перевести ткань из лабильного живого состояния в стабильное. Для этого используются два метода фиксации: 1) быстрое глубокое замораживание - достигается обычно путем использования жидкого азота (температура составляет -180°C); 2) химическая фиксация (используются различные вещества). Гистохимическая реакция проводится обычно на одинаково тонких срезах, полученных в камере криостата (температура $-25-30^{\circ}\text{C}$). Продукт гистохимической реакции для последующей визуализации в светоптическом микроскопе должен окрашиваться или обладать способностью к флуоресценции (см. раздел 4.2. и 4.4.).

Цитологический метод основан на изучении и оценке тонкой морфологической структуры клеток и их групп, полученных различными способами, в основном во время биопсии из патологического очага. Важной характеристикой является простота и быстрота цитологического метода. Он широко применяется в поликлинической практике и отделениях стационаров хирургического профиля. Возможность легко повторить исследование позволяет применить цитологический анализ для изучения динамики морфологических изменений, в том числе в процесс лечения, а также использовать метод для проведения профилактических осмотров. Цитологическое исследование позволяет получить заключение в течение 20-30 минут. Цитологическое заключение содержит описание клеточного состава и фона, на котором располагаются клеточные элементы. Поскольку клеточный состав коррелирует с патологическим процессом в органе, его исследование позволяет диагностировать характер патологического процесса: воспаление, пролиферативные и диспластические изменения, опухоль и степень ее зрелости. В тоже время в цитологический материал могут не попасть и отсутствовать отдельные типы клеток, могут нарушаться взаимоотношения между различными

клетками и внеклеточным матриксом. Поэтому результаты цитологических исследований должны носить предварительный характер, а окончательно подтверждаться морфологическим исследованием гистологических срезов.

Материалом для цитологического исследования служат мазки, соскобы, отпечатки с поверхности слизистых полости рта и шейки матки, а при эндоскопии - и с поверхности желудка, кишечника, бронхов, пунктаты из молочной железы, лимфоузлов, щитовидной железы, слюнных желез, печени, почек, легких, поджелудочной железы и других, полученные при тонко- или толстоигольной аспирации; жидкость из плевральной, брюшной полостей, полости сердечной сорочки (рис.20).



Рис. 20. Изготовление цитологических препаратов [oplib.ru].

Также можно использовать кусочки нефиксированной ткани, которые с помощью ферментов затем подвергают дезагрегации, т.е. разъединению и размельчению до отдельных клеток. Для этих же целей был предложен метод микродиссекции, позволяющий вырезать, вручную или с помощью микроманипуляторов, отдельные идентифицированные клетки или группы клеток на срезе под микроскопом с последующим их дополнительным анализом. В настоящее время для точной и воспроизводимой микродиссекции используют метод *лазерной микродиссекции*. При этом применяют либо принцип вырезания клеток микропучковым лазером либо принцип лазерного захвата – селективного прилипания

выбранных клеток к термопластической мембране, активированного лазером. Вырезанные/выделенные клетки хорошо сохраняются и могут быть подвергнуты учету на всех стадиях процедуры. Поскольку лазерная микродиссекция не разрушает окружающие ткани, поэтому с одного препарата могут быть взяты для анализа сразу несколько участков, например, содержащие разнородные морфологические структуры (патологические, нормальные и пограничные клетки). В общем, выбор способа забора материала определяется характером поражения, его локализацией, возможностью выполнения инструментальных исследований. Развитие эндоскопической техники, ультразвуковых и магнитно-резонансных методов исследования в немалой степени способствует широкому внедрению цитологического анализа в диагностику заболеваний практически всех органов и тканей организма.

В современных условиях имеется возможность автоматизированной сортировки неоднородного исследуемого материала по различным параметрам (размеры, структура клеток, уровень флюоресценции). Для этих целей служит *проточная цитометрия*. Методика заключается в проведении потока суспензии изолированных клеток толщиной в 1 клетку, окруженной обволакивающей жидкостью, через просвечивающий лазерный пучок. Степень рассеяния света лазерного луча позволяет получить представление о размерах и структуре клетки. В дальнейшем сигналы с фотоиндикаторов заряжают поток жидкости, отклоняя его при прохождении между электродами на величину соответствующую искомым параметрам клеток. Так реализовывается сортировка, а отсепарированные клетки посылаются в разные камеры (рис.21).

Полученный материал клеток в виде тонкого мазка сразу наносится на предметное стекло, высушивается, фиксируется и окрашивается. При обильном количестве материала соскоба, его можно подвергнуть исследованию с помощью гистологических методик. Суспензии предварительно центрифугируют, а мазки готовят из осадка. Использование

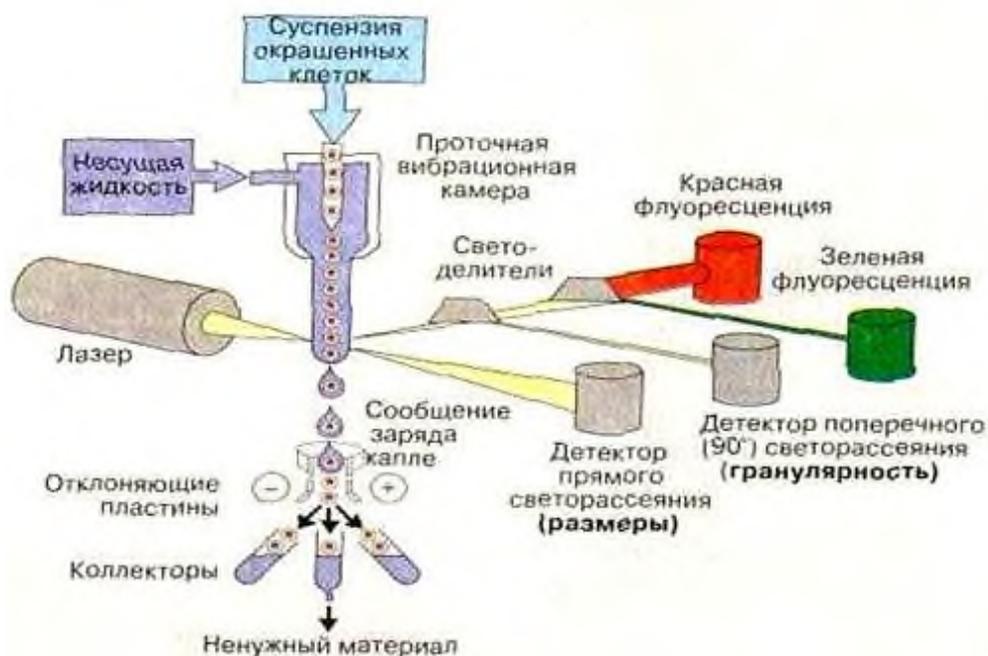


Рис. 21. Схема проточной цитометрии [orlib.ru].

цитоцентрифуги (цитоспин, CYTOSPIN) позволяет одновременно центрифугировать и осаждать на предметное стекло биологические объекты (клетки, микроорганизмы) находящиеся в жидкости. В результате получается идеальный монослойный клеточный препарат на ограниченной площади предметного стекла, клетки при этом не разрушаются. Получаемые препараты годятся как для обычных, так и для специальных способов окрашивания. Лучшим фиксатором для цитологических препаратов является метанол. Фиксацию в нем проводят в течение 3-10 минут. Кроме того, для фиксации может быть использован 100% этанол, но сроки фиксации при этом удлиняются до 10-30 минут. Изредка может применяться фиксация в смеси Никифорова сроком от 15 минут до 1-2 часов. Применение современных информационных технологий позволило повысить результативность цитологической диагностики по сравнению с обычной микроскопией мазков. Так система массового анализа PapNET одномоментно выводит до 20 полей зрения с цитологических мазков на экран компьютера и дает возможность в одном препарате изучить до 1000 полей зрения.

На сегодняшний день процесс приготовления гистологических и цитологических препаратов зачастую осуществляется в условиях большого объема материала и непрерывности его поступления. В целях оптимизации сроков выдачи заключения и необходимости улучшения качества почти все этапы данной работы автоматизированы (рис.22).



Рис. 22. Автоматизация гисто- и цитологической техники [medtech-invest.ru].

Для *электронной микроскопии* (ЭМ) берут в основном биопсийный материал. Также может быть использован и секционный материал, но в максимально короткие сроки после смерти, обычно исчисляемые минутами. Для данного исследования методы приготовления препаратов имеют специфику. ЭМ требует специальной физической или химической фиксации тканевых образцов. Для ЭМ иссеченный кусочек ткани размером 1x1,5 мм немедленно фиксируют в специальном фиксаторе. После фиксации фрагменты ткани обезвоживают, заливают в специальные

эпоксидные смолы, режут на ультрамикротоме. При этом получаемые срезы тканей должны быть ультратонкими, толщиной 30-50 нм. Затем их окрашивают (контрастируют) солями тяжелых металлов, переносят на специальные металлические сетки и изучают в ЭМ. В тоже время в ЭМ есть возможность в сканирующем режиме исследовать не только структуру объекта, но и его поверхность, напыляя на нее в вакуумной камере электроноплотные вещества и изучая эти реплики, повторяющие контуры поверхности объекта исследования. Параллельно с ЭМ из того же препарата можно получить полутонкие срезы, которые после гистологической окраски исследуют в световой микроскопии. Это помогает получить дополнительную информацию о состоянии той ткани, препарат из которой будет затем изучен в ЭМ.

Нативные препараты (живой, химически нефиксированный, неокрашенный, в противовес фиксированным препаратам) готовятся и исследуются сразу же после взятия материала, если это невозможно материал помещается в питательную среду (культуры клеток, тканей). Выделяют технику приготовления препаратов «висячая» и «раздавленная» капли (рис.23.). Живые объекты при приготовлении нативных препаратов «раздавленной» капли, не позднее 1 часа после взятия материала, разбавляют в физиологическом растворе, наносят каплю материала на чистое сухое предметное стекло, накрывают покровным стеклом, следя за тем, чтобы между стеклами не попадали пузырьки воздуха и влажный препарат изучают под микроскопом. Для приготовления «висячей» капли берут покровное стекло, в центр стекла наносят каплю исследуемого материала, взвешенного в физиологическом растворе. Затем покровное стекло быстро поворачивают каплей вниз и кладут на стерильное предметное стекло с вышлифованной посередине лункой, края которой предварительно смазывают вазелином, капля оказывается висящей в герметически изолированном пространстве. Для исследования живых и неокрашенных объектов используют специальных микроскопические методы, так называемая «витальная» микроскопия, раздел 3.1.1.



Рис. 23. Приготовление нативного препарата: А – «раздавленная» капля; Б – «висячая» капля [melytec.ru].

Культура клеток, ткани, органов - метод сохранения жизнеспособности тканей, целых органов (культура органа) или отдельных клеток (культура клеток) вне организма *in vitro* с созданием условий, обеспечивающих обмен веществ (питание и газообмен), удаление продуктов метаболизма, асептических условий, достигаемых, в частности, путем добавления антибиотиков (рис.24). В XIX веке английский физиолог С.Рингер разработал оригинальный солевой раствор, содержащий хлориды натрия, калия, кальция и магния для поддержания биения сердца животных вне организма. В 1885 году Вильгельм Ру установил принцип культивирования тканей, извлек часть костного мозга из куриного эмбриона и держал его в теплом физиологическом растворе в течение нескольких дней. Р.Г.Харрисон опубликовал результаты своих экспериментов в 1910 году (клетки зачатка нервной системы зародыша лягушки в капле лимфы), создал методологию культивирования тканей.

Особенностью органной или тканевой культуры является сохранение ими в течение долгого периода времени межклеточных взаимодействий, гистологической и биохимической дифференцировки и нерастущего равновесного состояния. Культуры клеток, наоборот, быстро лишаются структурной организации, теряют гистиотипическую архитектуру и биохимические признаки, а для достижения равновесного состояния обычно необходимо создание для них определенных условий. Клетки в культурах удобны тем, что они активно размножаются и тем самым обес-

печивается создание большой клеточной массы, ее в последующем можно разделить на идентичные параллели. При этом клетки нормальных

Культивирование клеток методом *in vitro*

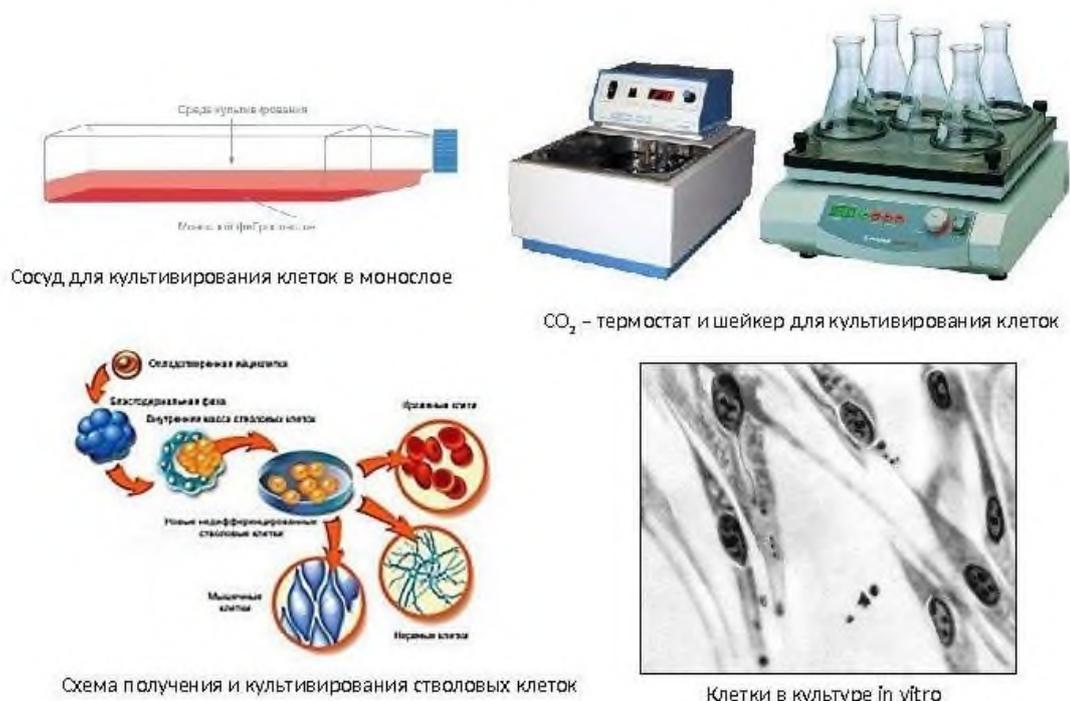


Рис. 24. Получение культур клеток [myshared.ru].

тканей, как правило, делятся ограниченное количество раз, поэтому их культуры имеют относительно короткую продолжительность жизни, в отличие от них культуры опухолевых клеток, способны размножаться неограниченно долго («иммортальность» - бессмертие). «Первичными» называют свежевыделенные культуры. Затем их подвергают субкультивированию (пассированию). Субкультивирование обеспечивает возможность сохранения клеток, их исследования, клонирования, получения более однородных популяций.

Техническое оборудование лабораторий, предназначенное для работы с культурами клеток и тканей, достаточно сложно и должно быть представлено: 1) оборудованием, обеспечивающим забор культур; 2) оборудованием для культивирования клеток; 3) микроскопическая техника; 4) приборы для консервации и хранения культур.

Количество типов клеток, которые в настоящее время научились культивировать, достаточно велико. Однако для того чтобы клетки раз-

множились, они должны представлять собой скорее незрелые клетки-предшественники, чем полностью дифференцированные клетки каких-либо тканей, ведь способность к пролиферации последних в норме утрачивается. Регуляция пролиферации и дифференцировки клеток обеспечивается их плотностью, взаимодействием с внеклеточным матриксом, питательными факторами среды, гормонами, ростовыми факторами и др.

Использование клеточных культур находит все более широкое применение в разных областях медицины и биологии. С их помощью решают такие важные общебиологические проблемы, как раскрытие механизмов пролиферации и дифференцировки клеток, взаимодействия клеток со средой и адаптации, старения и злокачественной трансформации и др. Клеточные культуры играют существенную роль в биотехнологии при производстве биологически активных веществ, в том числе вакцин, гормонов, ферментов, моноклональных антител, получаемым методами гибридной технологии и т.д. Так вакцина против полиомиелита стала одним из первых препаратов, массово произведенных с использованием технологии культивирования клеток.

Использование культуры клеток вне организма для диагностики заболеваний можно считать бесценным логическим продолжением метода биопсии. Именно благодаря культивированию практически неограниченно расширяется потенциалы исследования и диагностики. Теперь имеется возможность изучить не только морфологических и биохимических изменений, но и проследить динамические изменения в поведении клеток, их реакции на различные агенты, в том числе на воздействия лекарственных средств при испытании новых фармакологических веществ. В основе диагностики наследственных заболеваний лежит воспроизведение культивируемыми клетками в ряду поколений какого-либо дефекта или изменений, свойственного клеткам *in vivo*. Благодаря этой способности культивируемые клетки стали ценным объектом для генетики. На современном этапе возрос интерес к работе с культивируемыми клетками с применением методов молекулярной биологии.

ГЛАВА 3. МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОБЪЕКТОВ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. МАКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

Макроскопический метод - метод изучения биологических структур путем обычного осмотра «невооруженным глазом», без значительного увеличения изображения объекта. Использование лупы с небольшим увеличением также относят к макроскопическому методу. Однако на практике изучение макрообъектов не ограничивается макроскопическим исследованием. Такое изучение целесообразно называть «макроморфологическим», так как получаемая информация является не только визуальной. В ПА изучение и описание макрообъектов (труп, части тела, органы, фрагменты тканей) является начальным этапом морфологического анализа посмертного и прижизненного материалов, который в последующем дополняется микроскопическим и при необходимости молекулярно-биологическими исследованиями.

Описание патологических изменений в органах должно включать следующие основные макроморфологические и функциональные параметры:

1. Величина органа, его части или патологически изменённого участка ткани (весовой показатель, размерный параметр, объёмная характеристика).
2. Локализация патологического процесса в органе (при поражении не всего органа, а его части).
3. Конфигурация патологически изменённого участка органа или ткани (форма, характер поверхности - блеск, рельеф).
4. Цветовая характеристика ткани внешней поверхности и поверхности разреза, восприимчивость к красителям, реакция с красителями (обработка участка ишемии миокарда при инфаркте теллуридом калия и

солями тетразолия, проба с раствором Люголя при экспресс-диагностике псевдоэрозии шейки матки и др.).

5. Консистенция патологически изменённого участка ткани, запах.

6. Степень однородности патологически изменённого участка ткани по консистенции и цвету.

7. Функциональные пробы (проходимость желчевыводящих путей и др.) и пробы на наличие воздуха (воздушная эмболия, пневмоторакс).

В случае если параметр не отличается от нормы, его обычно не отражают в описании объекта.

3.2. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Микроскопические методы исследования - методы морфологического исследования, при которых используются специальные приборы, значительно увеличивающие изображение объекта (микроскопы). В медицине и биологии этими методами исследуют структуру объектов, размеры которых выходят за пределы разрешающей способности зрения человека (микроскопические). В основу микроскопических методов исследования входят световая (СМ) и электронная микроскопия (ЭМ). Предел разрешения светового микроскопа составляет 200 нм, а в электронном микроскопе он равен около 0,5 нм. Однако это не означает, что электронная микроскопия лучше. Цели, для которых предназначены эти микроскопы совсем разные. СМ более распространена в практике, она позволяет получить более общее и широкое представление о состоянии клеток и тканей. Световой микроскоп незаменим в скрининговой морфологической диагностике. Материал для него подготовить можно намного быстрее и проще. К тому же он позволяет наблюдать живые, нефиксированные объекты, что с помощью ЭМ сделать невозможно.

В СМ выделяют несколько типов, при которых используется различные свойства света: светооптическая, интерференционная, фазово-

контрастная, люминесцентная, стереоскопическая, поляризационная, инфракрасная, ультрафиолетовая и др. При этом принцип устройства всех световых микроскопов примерно одинаков. В основном они состоят из механической части и оптической системы. В механическую часть входят: основание микроскопа, тубус, тубусодержатель, предметный столик, система винтов для передвижения и револьвер. Оптическую систему составляют – объективы, окуляр и осветительный аппарат. Для предварительного осмотра препарата в основном применяют объективы малого увеличения ($\times 4, \times 10$), для изучения крупных клеток и гистологической картины в целом используют главным образом объективы среднего увеличения ($\times 20, \times 40$). Вследствие различия коэффициента преломления света в воздухе ($n=1$) и стекле ($n=1,52$) часть лучей осветительного аппарата, рассеивается, не попадая в объектив. При использовании объективов малого и среднего увеличения не требуется интенсивного освещения, поэтому в промежутке между фронтальной линзой и препаратом в этом случае находится только воздух, благодаря этому такие объективы еще называются «сухими». Объективы с большим увеличением ($\times 85, \times 90, \times 100$) называют «иммерсионными». При их использовании освещенность препарата должна быть максимальной; неизбежное рассеивание лучей устраняется применением так называемых иммерсионных жидкостей (вода, масло), коэффициент преломления света которых близок по значению к коэффициенту преломления стекла. Получение изображения объектов электронномикроскопического исследования происходит в результате воздействия на него направленного потока электронов.

3.2.1. Световая (светооптическая) микроскопия

Световая (светооптическая) микроскопия осуществляется на следующих определяющих принципах: разрешающая способность микроскопа (увеличение изучаемого объекта до 1000 раз), направление лучей освещения, свойства объекта исследования (в первую очередь проникае-

мость для просвечивающего пучка - прозрачность и непрозрачность). Поэтому в зависимости от особенности объекта исследования физические свойства света меняются. Меняются длина и амплитудой световой волны, а следовательно - ее цвет и яркость, трансформируются направление, фаза и плоскость распространения волны. В обычной СМ для выявления тех или иных свойств биологических объектов прибегают к их окрашиванию (рис. 25). Однако для этого клеточные и тканевые препараты должны быть фиксированными, так как воспринимают окраску определённые структурные элементы только погибших клеток. Краситель не проникает диффузно в живую клетку, не прокрашивает клеточные структуры, а обособляется в виде вакуоли в цитоплазме.

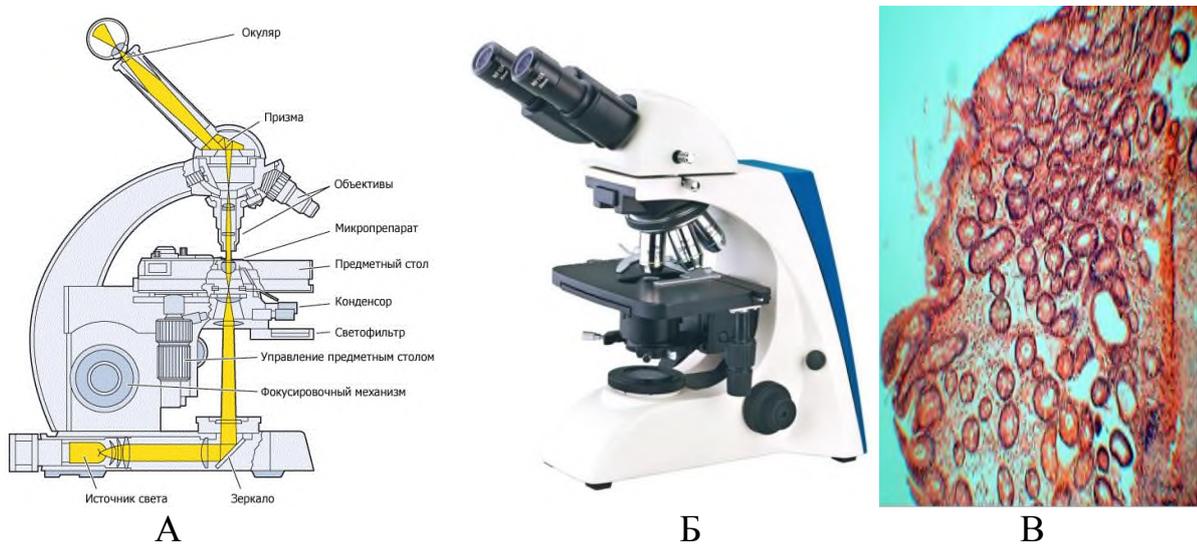


Рис. 25. Схема получения изображения объекта в светооптическом микроскопе (А), современный светооптический микроскоп (Б) [binox.cz], изображение объекта в светооптическом микроскопе (микротрепарат атрофический гастрит, окраска Гем./Эоз., x100) (В).

Несмотря на такие ограничения, СМ позволяет проводить исследование и живых (нефиксированных) биологических объектов (витальная микроскопия). Для этих целей, например, используют тёмнопольный конденсор (*инвертированная микроскопия*). В обычных микроскопах со стандартной оптической схемой устройства поместить емкость с культурой живых клеток между столиком и объективом не представляется возможным из-за недостаточности расстояния между ними. При инвертиро-

ванной (перевернутой) микроскопии объект наблюдения освещается не снизу, а сверху, объективы же, через которые ведется наблюдение, расположены под объектом (рис.26). Всё это позволяет наблюдать за живыми (нефиксированными) клетками как бы снизу вверх непосредственно в сосудах, где они культивируются, а также возникает возможность манипуляции с объектами в ходе микроскопии.



Рис. 26. Схема получения изображения объекта в инвертированном микроскопе [biojojo.blogspot.ru], современный инвертированный микроскоп и пример изображения в нем [melytec.ru].

Фазово-контрастная микроскопия, впервые описанная в 1934 году голландским физиком Ф.Цернике, является оптическим методом усиления контраста для формирования высоко четких изображений прозрачных объектов. В ее основе лежит дифракция луча освещающего объект, который в свою очередь меняет длину и фазу световой волны. При этом свет отклоняется от прямолинейного направления вблизи объекта и может заходить в область тени, формируя его визуальное изображение. (рис.27). В медицине фазово-контрастная микроскопия применяется для изучения живых (нефиксированных и неокрашенных) биологических объектов (простейших, клеток костного мозга и периферической крови, клеток культуры различных тканей и др).

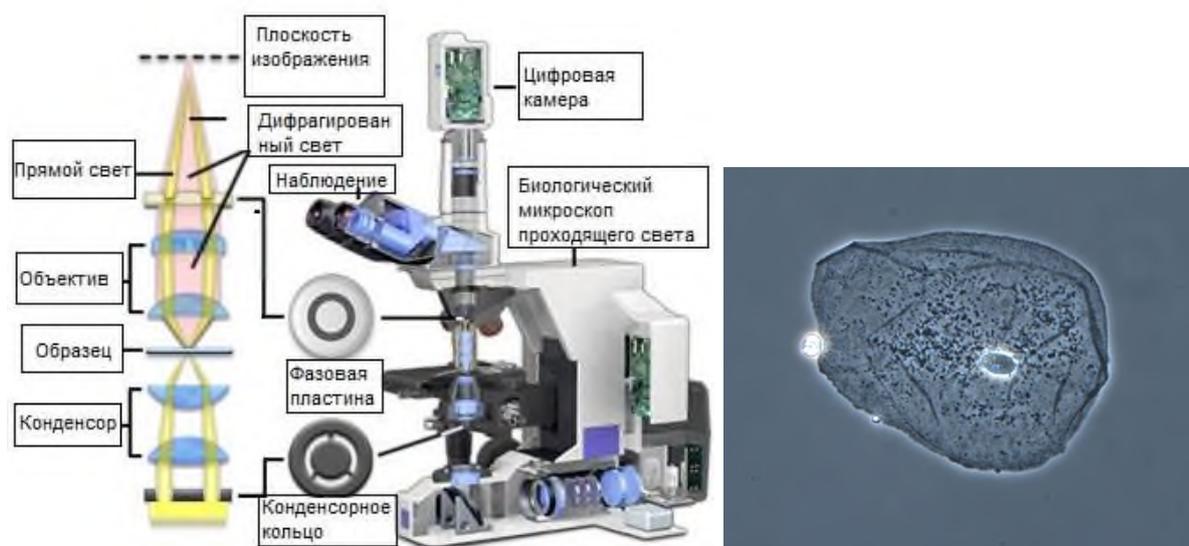


Рис. 27. Схема получения изображения объекта в фазово-контрастном микроскопе и пример изображения объекта в нем [biojojo.blogspot.ru].

Основой *поляризационной микроскопии* является получение изображения изучаемого биологического объекта в поляризованном свете, образованном двумя лучами во взаимно перпендикулярных плоскостях (рис. 28). Для этих целей используют, помещенные в микроскопе между источником света и препаратом, плёнчатые поляроиды или призмы Николя. Оптически разнородные структуры по-разному меняют степень поляризации (пропускают, отражают, преломляют) лучей света. Изотропные структуры (без строгой молекулярной ориентации) пропускают поляризованный свет одинаково и независимо от плоскости поляризации. Многие же биологические объекты имеют строгую молекулярную ориентацию и являются анизотропными. В них скорость распространения поляризованного света меняется в зависимости от направления по продольной или поперечной оси объекта. Такие свойства имеют коллагеновые волокна, реснички мерцательного эпителия, миофибриллы и др. В итоге о молекулярной организации структуры изучаемого объекта можно судить на основании сопоставления величины анизотропии и характера лучепреломления поляризованного света. Поляризационная микроскопия применима в гистологических, цитологических исследованиях, а также исполь-

зуется в микробиологической диагностике. Очень важно и полезно, что поляризованная микроскопия позволяет изучать нефиксированные препараты, как окрашенные, так и неокрашенные.

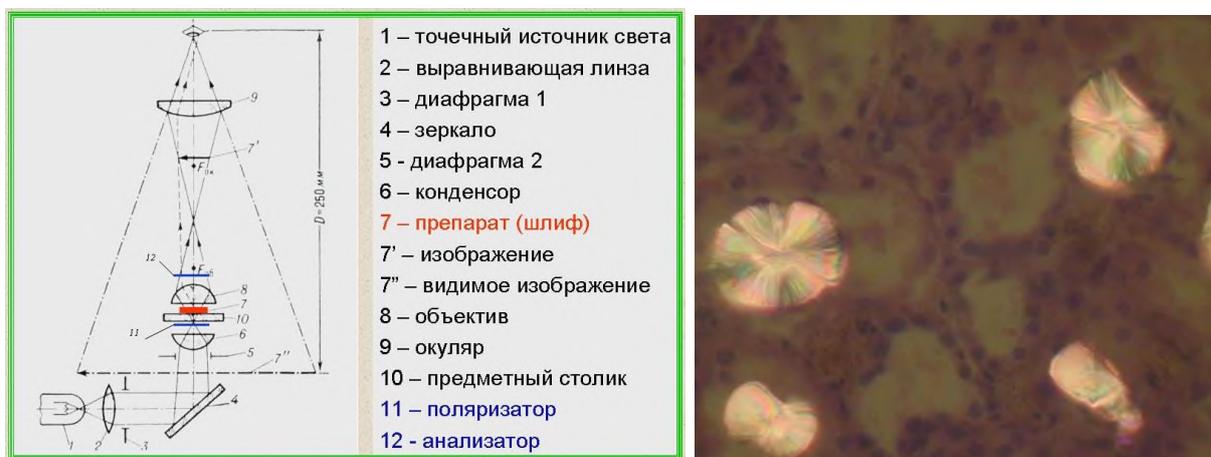


Рис. 28. Схема получения изображения объекта в поляризационном микроскопе, кристаллы оксалатов [forens.ru].

В основе *люминесцентной микроскопии* лежит уникальная способность некоторых веществ излучать свет после поглощения ими энергии возбуждения - люминесцировать в сине-фиолетовой сегменте спектра видимого света или УФ-лучах (рис.29). Так ряд биологических веществ, например некоторые белки, витамины, лекарственные средства обладают первичной (собственной) люминесценцией. Эта способность позволила найти применение люминесцентной микроскопии в морфологических исследованиях. Другие вещества, не обладающие собственной люминесценцией, могут выявляться при добавлении к ним специальных реагентов— флюорохромов (вторичная люминесценция) (см. раздел 4.4.). Флюорохромы могут инфильтрировать клетку диффузно либо взаимодействовать избирательно с отдельными клеточные структуры и определёнными химическими соединениями.

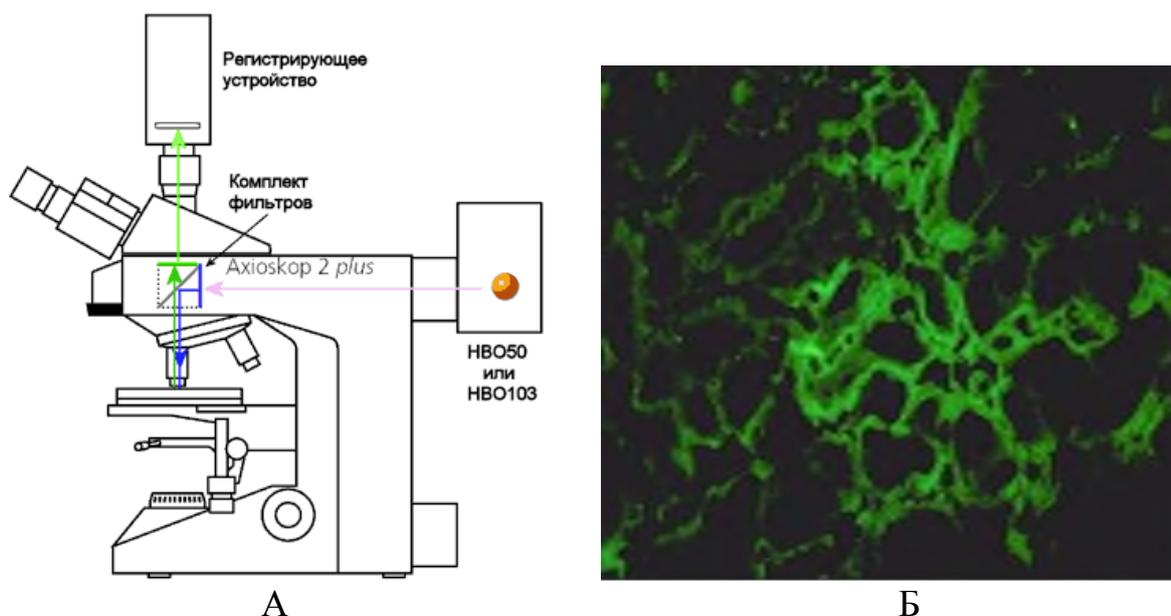


Рис. 29. Схема получения изображения объекта в люминисцентном микроскопе (А) [900igr.net], амилоидные массы в почках (Б).

Для проведения люминисцентной микроскопии используются либо специальные люминисцентные микроскопы, либо приставки к обычным биологическим микроскопам, позволяющие использовать их для наблюдения люминисценции микрообъектов. Микроскоп устанавливают в затемненной части комнаты. Источником «возбуждающего» света в люминисцентных микроскопах служат ртутно-кварцевые лампы, обладающие большой поверхностной яркостью. На пути светового потока непосредственно за кварцевой лампой помещают специальное стекло для защиты препарата от тепловых лучей. Комплект светофильтров позволяет выделить излучение нужной частоты, что повышает контрастность свечения объекта и защищает глаз исследователя от пагубного воздействия ультрафиолетовых лучей. Кроме того, предусмотрена возможность темнопольного освещения объекта и возможность фотографирования.

В *ультрафиолетовой и инфракрасной микроскопии* используется способность некоторых химических веществ, входящих в состав живых клеток и микроорганизмов или фиксированных препаратов, неокрашенных и прозрачных в видимом свете, поглощать ультрафиолетовые- и инфракрасные лучи определённых длин волн. Такими способностями

обычно обладают высокомолекулярные соединения, например, белки, ароматические аминокислоты, нуклеиновые кислоты, пуриновые и пиримидиновые основания и др. С помощью УФ-микроскопии можно исследовать не только локализацию таких веществ, но и их количество, а в живых объектах – еще и их метаболизм. Инфракрасная микроскопия в медицине преимущественно нашла свое применение при исследованиях в области офтальмологии и нейроморфологии.

Стереомикроскопия. По своей сути стереомикроскоп является «специальными» очками для наших глаз, позволяющими видеть нам объемные предметы под сильным увеличением не теряя пространственной ориентации. В отличие от лабораторных микроскопов, где изображение формируется одним оптическим каналом, а затем дублируется в тубусе и поступает к нам в глаза в виде двух одинаковых изображений в каждом окуляре, в стереомикроскопе изображение формируется иначе. Стереомикроскоп формирует различное изображение объекта в левом и правом окуляре, будто мы наблюдаем его с двух сторон (под углом стереоскопичности, обычно 11-15 градусов) при значительном увеличении в отраженном свете. Такой метод формирования изображения позволяет сохранить виртуальную объемность объекта. Наши глаза с легкостью определяют, на каком расстоянии находится тот или иной элемент исследуемого образца, а рельеф поверхности становится понятным с первого взгляда. Стереомикроскопы очень помогают в ситуациях, когда нам необходимо увидеть объемное увеличенное изображение исследуемого объекта с высокой контрастностью, четкостью и большой глубиной резкости. Только при использовании стереомикроскопа возможно проводить микроманипуляции с образцом в большом удобном рабочем пространстве. Стереомикроскоп незаменим, например, для проведения подготовки проб для электронной и оптической микроскопии и т.д. В настоящий момент существует два типа построения стереомикроскопов. Это схема Грену и схема Аббе (рис.30). У каждой схемы есть свои преимущества и недо-

статки, но обе они встречаются одинаково часто, хотя микроскопы, построенные по схеме Грену, дешевле параллельных систем.

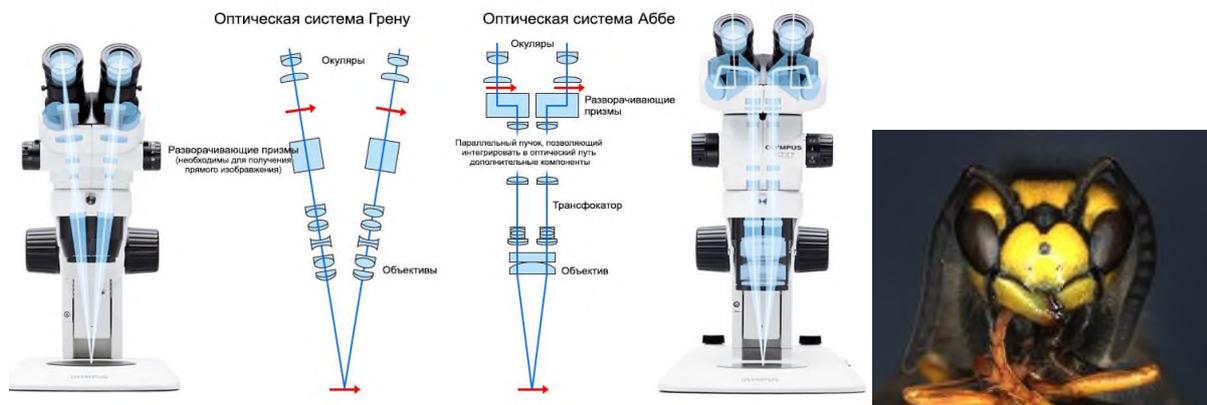


Рис. 30. Сравнение конструкций стереомикроскопов Грену и Аббе, стереомикроскопическое изображение головы пчелы [dmicro.ru].

При конструкции микроскопов по схеме Грену изображение, формируется двумя отдельными оптическими путями, расходящимися на угол стереоскопичности. Недостатком такой системы является наклон оптической оси объективов относительно образца. Наклоненный объектив строит трапециевидное изображение объекта в фокальной плоскости окуляра. Наши глаза обычно компенсируют этот эффект, но при длительной работе наблюдатель может испытывать усталость. Преимуществом схемы Грену является высокая глубина резкости изображения, отличная стереоскопичность, а также компактность конструкции. Кроме того, изображение в каждом канале стереомикроскопа Грену формируется центрально относительно оптической системы, что позволяет легче корректировать оптические аберрации.

Стереомикроскопы Аббе выполнены с одним главным объективом, располагающимся строго перпендикулярно исследуемому объекту. Диаметр объектива накладывает некоторые ограничения на угол стереоскопичности, ограничивая его до 11 градусов. Благодаря такой схеме достигается большое поле зрения и отсутствие искажений изображения. Кон-

структивно стереомикроскопы с общим главным объективом сложнее, требуют высокой коррекции aberrаций объектива и стоят дороже.

Для специальных целей в патологии используются и другие методы СМ - *интерференционная* и др.

3.2.2. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия применяется для исследования структуры на субклеточном и макромолекулярном уровнях, что обеспечивается увеличением изображения объектов до 70 тыс. раз. Впервые создали электронный микроскоп немецкие ученые Макс Кролль и Эрнст Руска в 1933 г. Высокую разрешающую способность ЭМ обеспечивает не пучок света, а поток электронов, создаваемый внутри электронного микроскопа электромагнитными линзами, создающими в вакууме электромагнитные поля. ЭМ бывает трансмиссивной (просвечивающей) и сканирующей (сняющей рельеф поверхности). При трансмиссионной ЭМ элементарные заряженные частицы проходят насквозь через структуры изучаемого объекта (подобно светооптической микроскопии). При сканирующей ЭМ они отражаются от поверхности и отклоняются под разными углами (рис. 31). Изображение формируется в результате взаимодействия электронов с люминесцирующим экраном микроскопа. При трансмиссионной ЭМ изображение внутриклеточных структур получается плоское (режим 2D), при сканирующей ЭМ – объемное (режим 3D). Первую применяют чаще. Весьма полезно сочетание ЭМ с другими методами идентификации объектов морфологического исследования – цито-, гистохимическими, иммуноцито- и иммуногистохимическими, автордиографическими методами. В этих условиях у исследователя появляется возможность наблюдать одновременно изменения внутриклеточных структур в сочетании с иммунологическими и биохимическими процессами в клетке – момент стыка морфологии с биохимией и иммунологией. Однако ЭМ требует

специальной химической или физической фиксации тканей (см. раздел 2.4.).

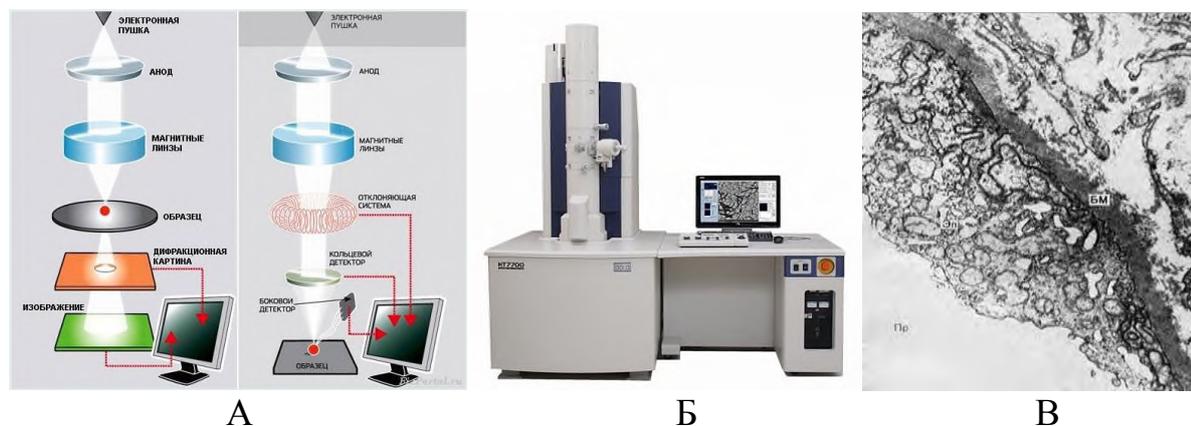


Рис. 31. Схема получения изображения объекта в просвечивающем и сканирующем электронных микроскопах (А), современный просвечивающий ЭМ (Б) [interlab.ru], электронограмма (эпителий канала почки при некротическом нефрозе) (В) (по Becker).

ГЛАВА 4. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ (ДЕТЕКЦИИ) ОБЪЕКТОВ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. БАЗОВАЯ И СЕЛЕКТИВНАЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ И ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОКРАСКА

Окрашивание необходимо для более отчетливого выявления различных клеточных и тканевых компонентов. Для исследования живых и неокрашенных объектов применяют специальные методы микроскопии, описанные выше (раздел 3.1.1.). В основе окрашивания морфологических структур лежат различные физико-химические процессы (адсорбция, абсорбция, диффузия, растворение и др.), которые происходят как в красителе, так и в самих клеточных и тканевых структурах. Большое значение для последовательности и скорости окрашивания имеет плотность ткани и дисперсность красителя. Некоторые вещества обеспечивают эффект окрашивания в результате растворения в выявляемых компонентах, например в нейтральных жирах. Другие красители участвуют в химических реакциях, например, при выявлении железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Зачастую процесс окрашивания становится возможным только при наличии протравы – например, гематоксилин способен окрашивать соответствующие структуры в присутствии солей металлов.

На сегодняшний день существуют тысячи различных методов окраски и их модификации. Выбор метода осуществляется исходя из задач исследования в каждом конкретном случае.

В гистологической практике красители делят на кислотные, основные и нейтральные. Кислотные красители – это сами кислоты или их соли, с помощью которых выявляются вещества щелочной природы (элементы цитоплазмы клеток, эритроциты и т.д.). Они окрашивают клеточные структуры в различные оттенки красного (эозин, конго красный,

эритрозин, оранжевый и др.). Основные красители - это основания или их соли, которые окрашивают вещества кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.). К ним относятся гематоксилин, кармин, тионин, толуидиновый синий, метиловый зеленый и др. В их цветовой гамме преобладают синие оттенки. Интенсивность окраски (базофилия) клеточных структур зависит от количества кислотных групп, способных взаимодействовать с основными красителями. В состав нейтральных красителей входят как базофильные, так и ацидофильные вещества (например, смесь Романовского-Гимзы). Эти красители могут растворяться в определенных веществах, окрашивая их (судан III, шарлах и др.).

Процесс гистологического окрашивания условно можно подразделить на прямой и непрямой, простой и сложный, прогрессивный и регрессивный, базовый (обзорный, универсальный) и избирательный (селективный, специальный, дифференциальный). Если раствор красителя взаимодействует непосредственно с тканью, то говорят о прямом окрашивании, а если после ее предварительной подготовки (протравливания) – непрямом. Если применяется один краситель, то это простое окрашивание, а при использовании нескольких – сложное. При прогрессивном типе окрашивания процесс продолжается до достижения интенсивного проникновения красителя в ткань, а регрессивный тип основан на первоначальном переокрашивании структур, после чего уже окраска дифференцируется до нужного уровня. Обзорные окраски используют для получения общего представления о состоянии исследуемой ткани (гематоксилин и эозин, азуран-бленд и др.) Специальные методы необходимы для исследования определенных тканевых структур или конкретных химических веществ.

В повседневной клинической и научной практике широко используют универсальную сложную гистологическую окраску срезов гематоксилином и эозином (рис. 32). Гематоксилин – краситель природного происхождения, его получают из коры тропического кампешового дерева.

Его тинкториальные (красящие) свойства проявляются в слабощелочной среде, и тканевые структуры окрашиваются в оттенки синего цвета. К ним относятся ядра клеток, отложения солей кальция, колонии грамположительных микроорганизмов, некоторые виды слизи, волокнистая соединительная ткань в состоянии мукоидного набухания. Эозин - синтетическая розовая краска, названа по имени древнегреческой богини зари Эос («цвет утренней зари»). Эозин работает в кислой среде (рН менее 7,0), окрашивая так называемые оксифильные компоненты в оттенки красного цвета. К ним относятся цитоплазма клеток, волокнистые структуры, неизменённое межклеточное вещество, белковые массы и большинство видов слизи.

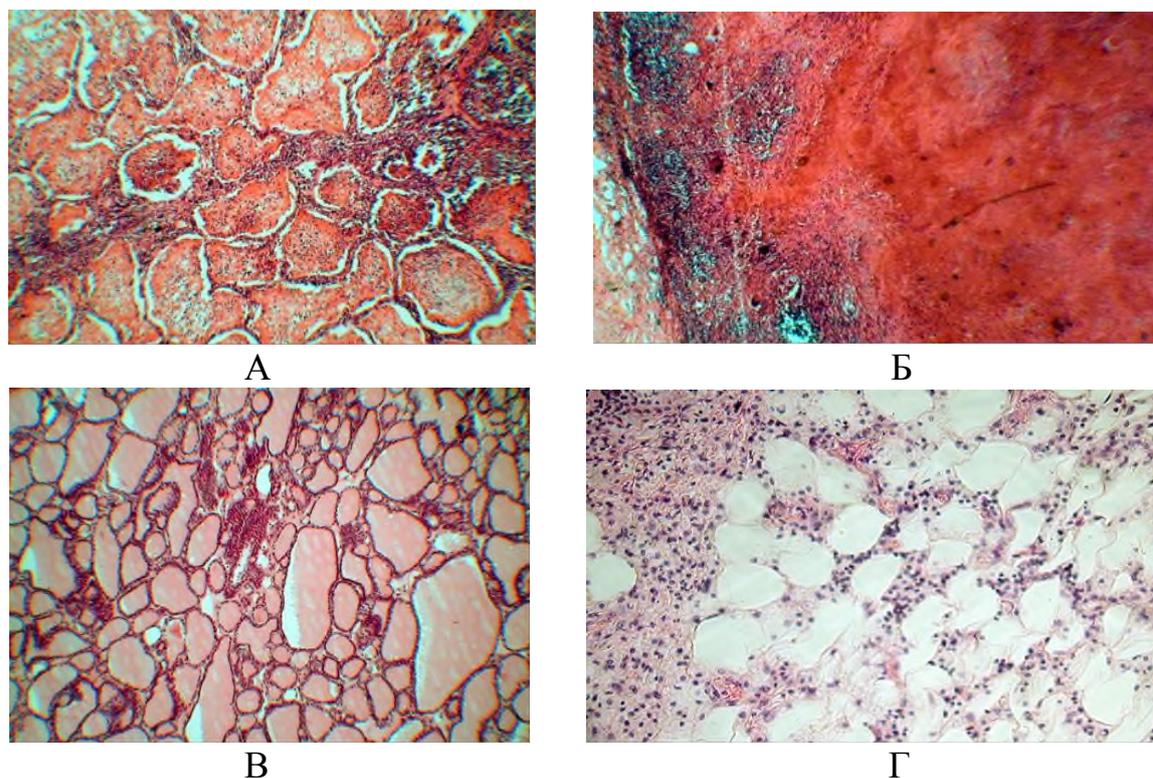


Рис. 32. Базовая гистологическая окраска - гематоксилином и эозином: А – крупозная пневмония; Б – некроз лимфатического узла; В – коллоидный зоб; Г – флегмона жировой клетчатки.

Среди специальных методов окрашивания широко распространено выявление волокнистых структур соединительной ткани, в первую очередь, коллагеновых волокон. В России традиционно используется метод

Ван Гизона (I. Th. van Gieson). При этом железный гематоксилин Вейгерта окрашивает ядра клеток, грам-положительные микроорганизмы, депозиты кальция в чёрный цвет, кислый фуксин красит красным цветом коллагеновые волокна и гиалин, а остальные структуры межклеточного вещества и цитоплазма клеток окрашиваются в жёлто-зеленый цвет пикриновой кислотой. На западе для этих целей широко применяют трихромные (трёхцветные) методы окраски, в основе которых лежит использование фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот (метод Мэллори, метод Массона и др.). При этом синим цветом окрашиваются коллагеновые волокна, голубым – ретикулярные (ретикулиновые), а эластические - красным. Для окрашивания нервной ткани также используются специальные методы: окраска толуидиновым синим по Нисслю или аммиачным серебром по Бильшовскому-Гросс.

Окраску конго-красным используют для определения отложений амилоида и другие. Кроме этого, гистологические и цитологические исследования можно использовать для выявления вне и внутриклеточных инфекционных агентов (окраска по Цилю-Нильсену для выявления холерного вибриона, возбудителей туберкулеза, лепры), как ориентировочный метод установления этиологии заболевания (рис.33).

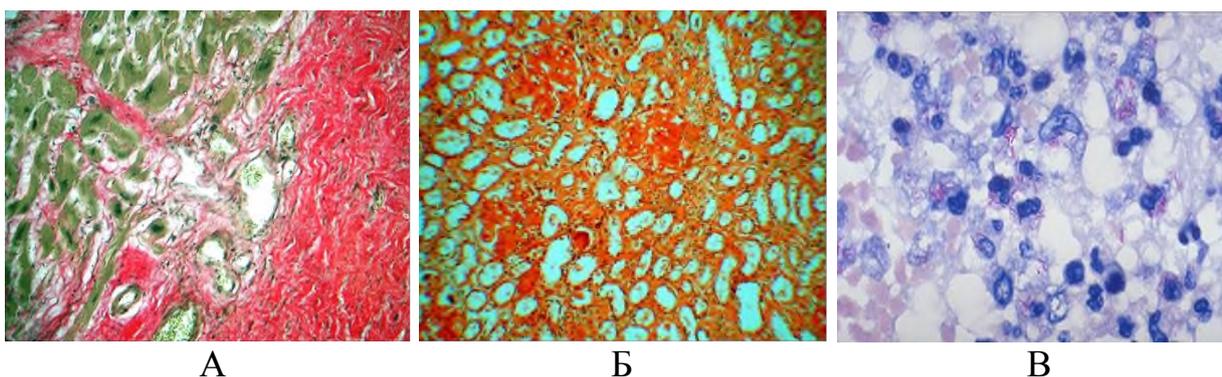


Рис. 33. Специальные окраски: А – окр. пикрофуксином по Ван Гизону на коллаген (микропрепарат постинфарктного кардиосклероза), Б – окр. конго-красный (микропрепарат амилоидоза почек), В.- окр. по Цилю-Нильсену для выявления возбудителя туберкулеза (по Edward C. Rlatt MD, 1999)].

Наиболее распространенными методами окраски *цитологических препаратов* являются окраска азур-эозином (напоминает гематоксилин и эозин), бисмарк-брауном по Папаниколау, по Романовскому-Гимзе, Лейшману, Май-Грюнвальду. Качество окраски зависит от вида и состава красителя, его концентрации, продолжительности окрашивания, pH среды, температуры воздуха. В цитологических исследованиях с успехом применяются цито- и иммуноцитохимические методики. Так, в клетках мазков выявляют неспецифические эстеразы, нуклеиновые кислоты, гликоген, муцины и т.д. Кроме этого, цитологические исследования используют для выявления внутриклеточных инфекционных агентов (рис. 34).

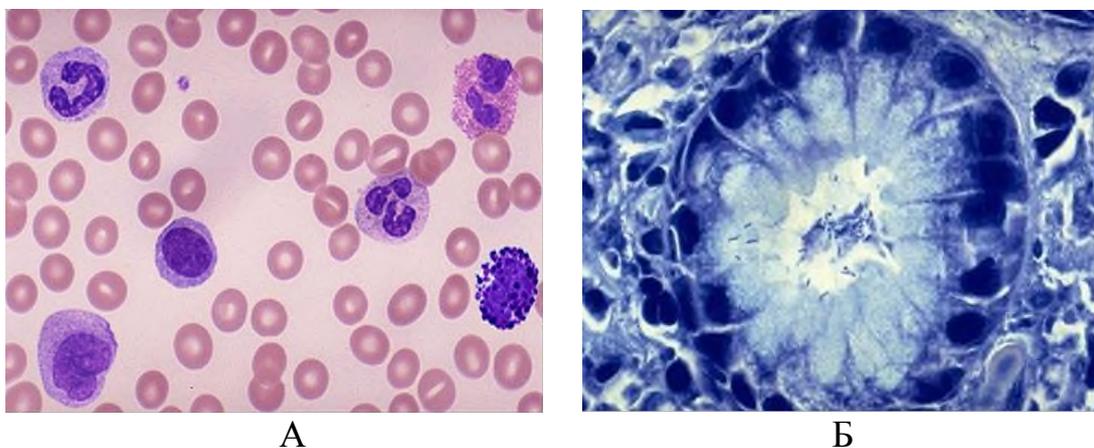


Рис. 34. Цитологическая окраска по Романовскому-Гимзе: А - мазок крови; Б - железа слизистой желудка с хеликобактер пилори (по Edward C. Rlatt MD, 1999).

4.2. ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ

Для изучения химического состава клеток и тканей в течение длительного времени применяли классические биохимические методы путем суммарного определения веществ в размельченной ткани (гомогенате). Однако, несмотря на ряд позитивных качеств, эти методы не позволяли получить полное представление о локализации тех или иных химических веществ в различных клеточных и тканевых структурах. Результатом дальнейшего научного поиска стало появление гистохимического метода,

который, объединяя в себе гистологический и биохимический, позволял определять локализацию химических веществ в целостных структурах органов и тканей.

Гистохимия (цитохимия) - раздел морфологии, изучающий химический состав тканей и клеток при сохранении их структуры, а также определяющий локализацию различных химических веществ в компонентах тканей, типах клеток и клеточных структурах. Основной целью гистохимии является установление связи между выявляемыми веществами и их структурной организацией. При данных методиках различные вещества органической и неорганической природы, входящие в состав клеток, вступают в химическую реакцию с определенными реактивами (красителями), результатом чего является образование окрашенных продуктов. По интенсивности окрашивания можно судить и о количественном содержании искомого вещества в тех или иных структурах.

Гистохимические методы, как правило, складываются из 3-х этапов: 1) подготовка ткани (см. раздел 2.4.); 2) гистохимическая реакция; 3) оценка результатов реакции.

Основные принципы гистохимических реакций:

1. Краситель взаимодействует с определенными химическими группировками. Например, основные красители (пиронин, толуидиновый синий и др.) вступают в реакцию с фосфатными группами РНК, образуя солеобразные окрашенные соединения.

2. Краситель может растворяться в химическом субстрате, входящем в состав клеточных и тканевых структур. Например, суданы растворяются в нейтральных жирах, окрашивая соответствующие включения в клетках.

3. Некоторые клеточные компоненты не взаимодействуют с красителями (например, ДНК, полисахариды). В таких случаях предварительно переводят их химические группировки в реакционно-активное состояние (ДНК гидролизуют с использованием хлористоводородной кислоты, а полисахариды окисляют йодной кислотой). При этом формируются ак-

тивные химические группы, которые уже способны вступать в реакцию с красителями и образовывать окрашенный продукт реакции.

4. Иногда для перевода неокрашенного продукта реакции в окрашенный приходится прибегать к многоступенчатым промежуточным реакциям. Обычно это применяется при детекции ферментов (гистоэнзиматические исследования).

Данный метод получил широкое распространение в исследовательской практике. Гистохимические и гистоэнзиматические методы позволяют изучать клеточный и тканевой метаболизм, как в норме, так и в патологии. С их помощью можно избирательно оценивать обмен белков, жиров, углеводов и других веществ, определять локализацию и активность ферментов и гормонов, анализировать окислительно-восстановительные процессы в клеточных и субклеточных структурах. Поэтому диапазон применения этих методов в патологии достаточно широк. Так, использование судана III позволяет выявить липиды при атеросклерозе, жировой дистрофии органов и других обменных расстройствах. С помощью альцианового синего определяют слизь, что имеет особое диагностическое значение при муковисцидозе. Окраска по Бесту применяется для выявления гликогена (например, в почках при сахарном диабете). Окраска на берлинскую лазурь (реакция Перлса) выявляет соединения железа при гемосидерозе. Генциан-виолет можно применять для выявления амилоида в различных органах и тканях при туберкулёзе или других хронических воспалительных процессах. При ДВС-синдроме можно выявлять фибрин по методу Вейгерта. Орсеин позволяет оценить состояние эластических волокон и др. (рис. 35).

Энзимогистохимические методы позволяют исследовать ферменты в тканях и клетках *in situ*, не подвергая их разрушению, связанному с гомогенизацией, аутолизом, элюцией и резорбцией в процессе выделения, что может привести к ошибочной интерпретации результатов. Это можно сделать не только на тканевом, но также на клеточном и субклеточном

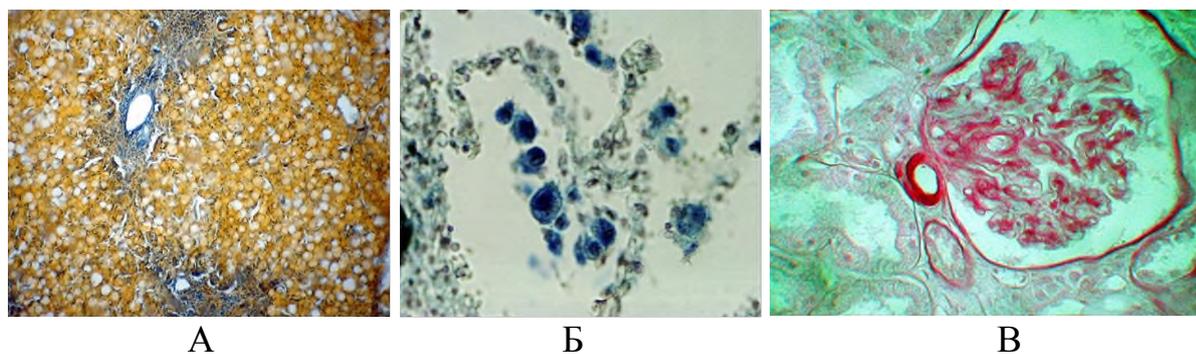


Рис. 35. Гистохимические реакции: А – судан III взаимодействует с жирами (жировой гепатоз); Б – окраска по Перлсу выявляет соединения железа (гемосидероз легкого) (по Edward C. Rlatt MD, 1999); В – ШИК-реакция на углеводы (почка при сахарном диабете).

уровнях. В основе энзимогистохимических методов лежит выявление продукта ферментативной реакции. При этом, строго говоря, определяется не сам фермент, а его активность. Гистохимическая реакция выявления ферментативной активности состоит из двух этапов - собственно ферментативной реакции и одновременной или последовательной реакции «захвата» с образованием окрашенного конечного продукта гистохимической реакции (нерастворимого хромогена) (рис. 36).

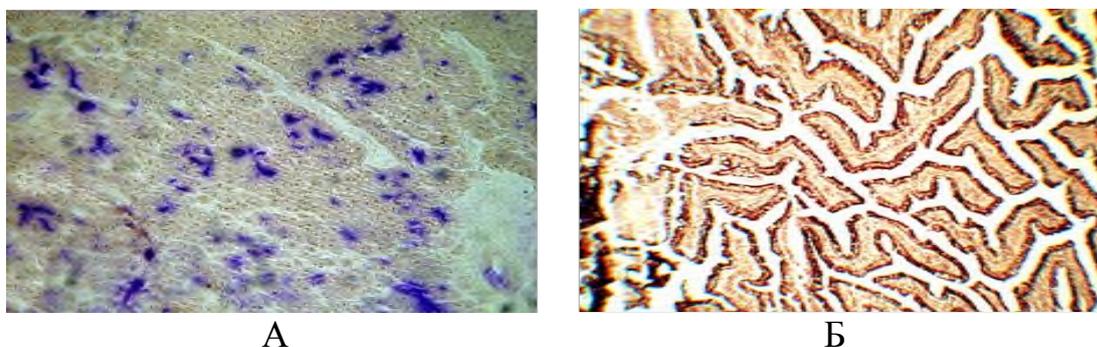


Рис. 36. А - Высокая активность щелочной фосфатазы капилляров миокарда и большая плотность сети МЦР. Реакция азосочетания по Берстону с AS-BS-фосфатом нафтаола; Б - Активность НАД·Н₂-дегидрогеназы в эпителии кишечных ворсинок. Тетразолиевый метод Берстона с использованием нитросинего тетразолия.

В настоящее время ни одна морфологическая лаборатория не обходится без использования гистохимических и гистоэнзиматических методов. Однако, они достаточно сложны и трудоемки в использовании, по-

скольку требуют усвоения определенных навыков и соблюдения ряда условий. Гистохимические методики основаны на избирательных химических взаимодействиях и обладают строгой специфичностью. Особая точность и тщательность в работе являются одними из главных требований для их применения. Для интерпретации результатов гистохимической реакции оценивают не только локализацию искомого вещества, но и интенсивность окраски исследуемых морфологических структур, так как она позволяет судить о концентрации выявляемых химических соединений. И если при гистологической обработке материала могут быть допущены небольшие отклонения в ходе окрашивания препарата, то приемы, используемые при проведении гистохимических реакций, должны выверяться особо тщательно, ибо любая погрешность может изменить ход реакции и дать неправильный результат.

Оценка результатов реакций может проводиться визуально (качественно) и количественно (с помощью специальной аппаратуры). Качественная оценка возможна при выраженных изменениях активности, когда разница в интенсивности окраски продуктов реакции заметна визуально. Для характеристики более тонких, невидимых глазом изменений необходимо проводить количественную оценку интенсивности окраски фотоспектрометрическим методом (путем определения оптической плотности окрашенного вещества в гистологических срезах). Количественная оценка результатов реакции гораздо предпочтительнее, поскольку позволяет получить объективные и достоверные цифровые характеристики изучаемых явлений. Для этой цели в настоящее время применяют специальные приборы (цитоспектрофотометры, микрофлюорометры), позволяющие определять количественную характеристику интенсивности окраски с высокой точностью, что особенно важно для оценки метаболических процессов в исследуемых морфологических структурах. При использовании столь чувствительных методов количественной оценки, требования к качеству проведения гистохимических реакций и неукосни-

тельному соблюдению строгой стандартизации обработки сравниваемых объектов, приобретают еще большее значение. Гистохимические методы часто сочетают с другими методами световой и электронной микроскопии.

4.3. ИМПРЕГНАЦИЯ СОЛЯМИ МЕТАЛЛОВ

Импрегнация (И., «наполнять», лат.) – это метод выявления некоторых структурных элементов путем пропитывания микрообъектов морфологического исследования растворами солей металлов. Последние способны восстанавливаться в определенных тканевых структурах, благодаря чему происходит их стойкое окрашивание в черный, бурый или другой цвет в зависимости от количества и свойства восстановленного металла. Данный метод используется как в световой, так и электронной микроскопии. В гистологической практике для импрегнации обычно применяются соли серебра (азотнокислое серебро AgNO_3), золота (хлористое золото $\text{AuCl}_3+2\text{H}_2\text{O}$), а также осмиевая кислота. Растворами солей металлов можно обрабатывать как свежие (нефиксированные) объекты, так и полученные из них гистологические срезы. Наиболее важным этапом процесса импрегнации является восстановление соли металла. Оно может происходить в ткани спонтанно без каких-либо дополнительных воздействий. Искусственно стимулировать этот процесс можно с помощью вспомогательных воздействий, при которых процессы восстановления совершаются значительно быстрее и энергичнее (например, свет, подкисление, нагревание). Кроме того, можно использовать восстанавливающие средства (формальдегид, пирогалловую кислоту и т.д.). В ряде случаев после завершения процессов восстановления необходимо удалить остатки соли металла, промывая препараты (срезы) раствором гипосульфита. Если импрегнации подвергаются только определенные тканевые структуры, а остальные элементы остаются интактными, то изображение называют негативным. А когда, напротив, все элементы тканей импрегниру-

ются и лишь некоторые их части остаются неокрашенными, то это позитивное изображение. Азотнокислое серебро в качестве основного реактива для импрегнации впервые было предложено Реклингаузенем и Гисом (Recklinghausen, His). Оно формирует легко восстанавливаемое соединение с так называемым спайным веществом эпителия и гладких мышц, а также с основным веществом соединительной ткани, придавая этим структурам черный или бурый цвет. Кроме этого, импрегнация широко используется для исследования нервной ткани, поскольку серебро способно откладываться в нервных клетках, осевых цилиндрах, а при определенной обработке и фиксации - в глиальных элементах. Среди многообразия способов наиболее популярен метод Гольджи и его модификации. Левадити (Levaditi) предложил способ импрегнации спирокет в тканях, имеющий в настоящее время много модификаций. Хлористое золото так же как осмиевая кислота, восстанавливается в жирах, поэтому часто применяется для импрегнации тканей, богатых липоидами, особенно миелином, придавая им фиолетовую окраску. Помимо этого, при помощи золота можно выявлять нейрофибрилы нервных клеток, а также тончайшие нервные нити и нервные окончания (роговой оболочки глаза, кожи и др.). Впервые хлористое золото для импрегнации было применено Конгеймом (Cohnheim; 1866), и в настоящее время его способ приобрел множество модификаций - Бастиани, Колосова, Ранвье, и др. Однако, все имеющиеся на сегодняшний день способы импрегнации чрезвычайно капризны, и условия, при которых данный процесс протекает наиболее оптимально, мало изучены. В ряде случаев, помимо изолированного применения золота или серебра, употребляется и комбинированная обработка сразу двумя реагентами. На кафедре патологической анатомии Башкирского медицинского института профессором В.А. Жухиным разработаны оригинальные методики импрегнации элементов ретикулоэндотелиальной системы солями серебра и золота, получившие его имя (методы импрегнации по Жухину) (рис. 37).

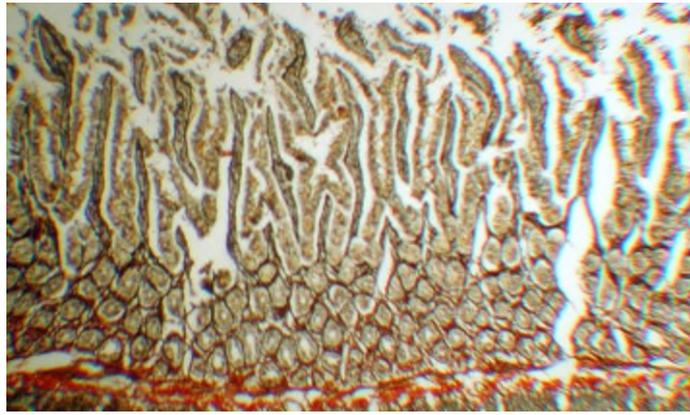
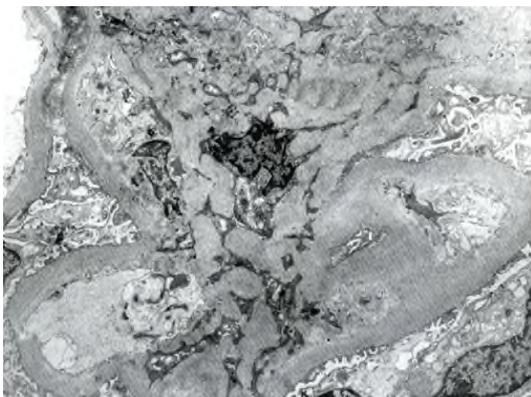
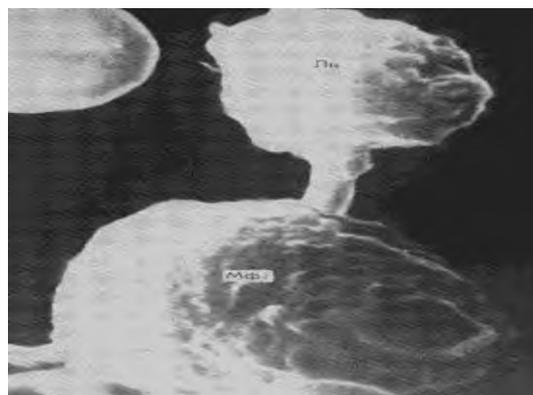


Рис.37. Импрегнация нитратом серебра по В.А. Жухину (тонкая кишка: деструкция соединительнотканного каркаса в апикальных отделах ворсинок).

По отношению к «окрашиванию» препаратов в электронной микроскопии более распространен термин «контрастирование», поскольку изображение их черно-белое. Для контрастирования в образцы вводят атомы тяжелых металлов: осмия, вольфрама, рутения, урана, свинца. Структуры, связавшие большее количество этих атомов, сильнее отклоняют электроны и представляются более темными на экране и позитиве и более светлыми на негативе (рис.38). Наиболее распространено контрастирование путем введения контрастных веществ в срезы. Основные трудности, возникающие при контрастировании – низкая специфичность и образование осадков. Специфичность повышается путем подбора оптимальных концентраций веществ, pH, продолжительности обработки.



А



Б

Рис. 38. Импрегнация, электронная микроскопия: А – утолщение базальных мембран капилляров клубочков почек при сахарном диабете (просвечивающая ЭМ); Б – цитоплазматический мостик между лимфоцитом и макрофагом (сканирующая ЭМ, по Кларку и др.).

4.4. ФЛЮОРОХРОМИЯ

Флюорохромия – метод обработки микрообъектов в люминесцентной микроскопии, не обладающих природной способностью люминесцировать, специальными красителями (флюорохромами - греч. *chroma* - цвет, краска, «люминесцентные маркеры») с целью придания способности к люминесценции, увеличения силы и контрастности свечения (см. раздел 3.1.1.). При искусственном введении флюорохромы адсорбируются клетками и тканями, придают им способность люминесцировать (вторичная люминесценция). Возбуждение люминесценции микроскопических объектов окрашенных Ф., производится ультрафиолетовым, фиолетовым и синим светом. Флюорохромами являются красители (ауромин, корифосфин и др.), пигменты и их производные (хлорофилл, порфирины), некоторые алколоиды (берберин) и др. Флюорохромы могут распределяться в клетке диффузно, либо избирательно окрашивают отдельные клеточные структуры или определенные химические соединения биологического объекта. На этом основано применение люминесцентной микроскопии при цитологических и гистологических исследованиях, поскольку метод дает преимущество в идентификации деталей морфологических структур по сравнению с обычным окрашиванием (в особенности, биологических объектов). Благодаря большой чувствительности люминесцентной микроскопии концентрация флюорохрома может быть очень малой, что позволяет производить наблюдение и на живых биологических объектах (прижизненное флюорохромирование) и исследовать происходящие в них процессы обмена веществ.

Наибольший интерес представляет акридин оранжевый (рис. 39), который вызывает полихроматическую флуоресценцию нуклеиновых кислот. При этом ДНК ярко флуоресцирует желто-зеленым цветом, а РНК - рубиново-красным. Акридиновый оранжевый, кроме того, применяют в комплексной диагностике злокачественных опухолей в цитоло-

гических и гистологических препаратах. На различной способности воспринимать флуоресцирующий краситель ишемизированными и нормальными тканями основано, например, применение метода в диагностике ранних сроков инфаркта миокарда.

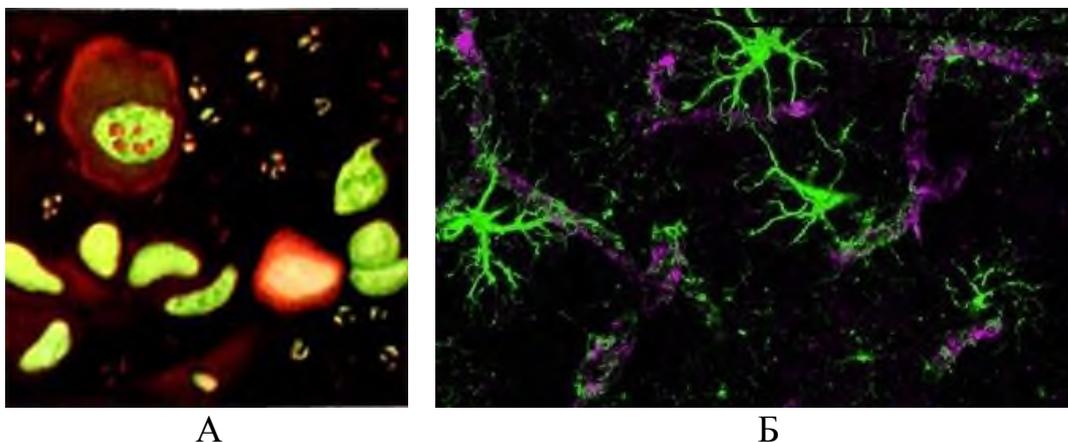


Рис. 39. Люминесцентная микроскопия, флюорохром - акридиновый оранжевый: А - Клетки рака в соскобе с шейки матки; Б – комплекс ДНК-акридин оранж излучает желтовато-зеленый свет, а комплекс РНК-акридин оранж - красновато-оранжевый свет [medicalplanet.su].

Существуют специальные флюорохромы для выявления некоторых химических веществ в объектах:

- корифосфин применяют для выявления кислых мукополисахаридов;
- кофеин 5 и родамин могут быть использованы для определения гликогена;
- фосфин 3Р применяют для определения липидов;
- тиофлавин окрашивает амилоид (зеленая люминесценция);
- с помощью раствора раморина в спирте определяют кальций в тканях (зеленая люминесценция);
- при обработке препаратов раствором солохрома черного удается выявить алюминий (жёлто-оранжевая люминесценция);
- с помощью рол амина 6G в лёгких определяют сурфактант (оранжевая люминесценция).

Иммунофлюорохромия (метод флюоресцирующих антител (МФА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ)) заключается в визуализации реакции антиген-антитело люминесцентными маркерами (метод качественного и количественного определения антигена по известному иммуноглобулину или антитела по известному антигену). Метод конъюгации глобулинов с органическими флюорохромами разработан в 1942 году А.Кунсом. Различают прямой МФА и непрямой МФА с комплементом. При помощи иммунофлюоресценции в соответствующем микроскопе можно выявлять наличие различных антигенов в клетках и тканях, а также оценивать их концентрацию. Это служит целям идентификации вирусов, определения антител и иммунных комплексов, гормонов, ферментов, различных метаболитов и др. Поэтому люминесцентную микроскопию можно применять в диагностике герпеса, эпидемического паротита, вирусных гепатитов, гриппа и других вирусных инфекций. Метод используется в экспресс-диагностике респираторных вирусных инфекций, исследуя мазки-отпечатки слизистой оболочки верхних дыхательных путей, в том числе при дифференциальной диагностике различных инфекций. В патоморфологии люминесцентная микроскопия с использованием антител, меченных флюорохромами, позволяет идентифицировать некоторые иммунопатологические процессы, опухоли, амилоид (рис. 40). Недостатками всех видов МФА является ограниченная чувствительность по причине возможных перекрестных реакций между объектами, имеющими близкий антигенный состав. Кроме того, негативное влияние может оказать неспецифическая флюоресценция вследствие адсорбции флюоресцирующих глобулинов на различных элементах препарата.

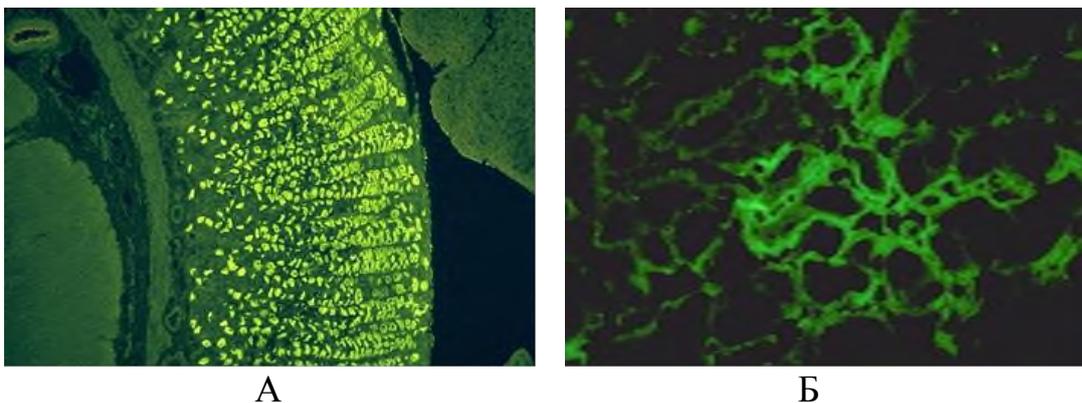


Рис. 40. Иммунофлюорохромия: А – аутоиммунный гастрит (по Edward C. Rlatt MD, 1999); Б – амилоидоз почек.

4.5. ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ, ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ) РЕАКЦИИ

Иммуноморфология в настоящее время представляет собой группу методов, позволяющих идентифицировать структурные компоненты *in situ* благодаря специфической реакции антиген-антитело, продукт которой при определенных условиях становится видимым в световом или электронном микроскопе. Существует несколько классификаций иммуноморфологических методов: по объекту исследования цитологический и гистологический, по метке антител – иммунофлюоресцентный (см. раздел 4.4.), иммуноферментный, иммуноизотопный (см. раздел 4.6.) и др.; в зависимости от выявления антигена до или после заключения ткани в заливочную среду – «пре-имбеддинг» и «пост-имбеддинг». В основу наиболее распространенной классификации положен принцип либо непосредственного взаимодействия меченного антитела с антигеном (прямой), либо опосредованного – через немеченые антитела (непрямой).

Суть *иммуногистохимии* (ИГХ) заключается в определении локализации антигена (опухолевого, вирусного, микробного, аутоантигена и др.) в тканях (клетках) с помощью специфических антител, т.е. в основе данного метода лежит высокоспецифическое иммунологическое взаимодей-

стве антигена с антителом в биологических объектах. Это означает, что иммунологические реакции "переносятся" на предметное стекло морфолога. На гисто- или цитологические препараты наносят антитела к искомым антигенам. В роли такого антигена могут выступать как целые фракции (митохондриальная, ядерная и др.), так и отдельные химические соединения (белки, пептиды и др.). Комплексы «антиген-антитело» при обычной микроскопии не видны, поэтому для их визуализации используют метки. Если искомый антиген присутствует в исследуемых объектах, то образующийся комплекс антиген-антитело-метка точно укажет его локализацию. В качестве метки с антителом может быть связан либо флуорохром (краситель, дающий флуоресценцию, раздел 4.4.), либо красящий фермент (чаще всего используется пероксидаза хрена - иммунопероксидазный метод). Наиболее распространены две модификации иммунопероксидазного метода - пероксидазно-антипероксидазный (РАР-метод) и метод авидин-биотинового комплекса (АВС-метод). Популярность иммунопероксидазного метода связана, в основном, с его относительной простотой и доступностью. Преимущества данного метода к иммунофлуоресцентному анализу определяются несколькими причинами: 1) окрашенные срезы можно наблюдать в световом микроскопе и при докрашивании ядер или цитоплазмы видна клеточная и гистологическая картина изучаемой ткани; 2) срезы, окрашенные этим методом, могут сохраняться долго, что делает возможным ретроспективный анализ результатов; 3) прорыв в области демаскировки антигенных детерминант и интенсификации иммуногистохимического окрашивания позволяет изучать срезы с парафиновых блоков, которые хранились годами; 4) прогресс в области получения моноклональных антител сделал возможным анализ экспрессии практически любого антигена; 5) в настоящий момент различными компаниями разработаны простые в использовании наборы поли- и моноклональных антител для иммуногистохимической диагностики к широкому спектру антигенов.

Прямой метод иммуномечения явился первым иммуноморфологическим подходом, основанным на непосредственном выявлении антигена в ткани с помощью меченных антител. Однако в целом же прямой метод наименее чувствителен по сравнению с остальными модификациями, однако чрезвычайно прост, поэтому его до сих пор часто используют при экспресс-анализе. В случае применения непрямого метода, первичные (специфические) немеченые антитела выявляют с помощью меченных вторичных антител к первичным антителам, выступающим по отношению к ним как антигены. Преимущества непрямого метода по сравнению с прямым заключаются в том, что: 1) антисыворотка к первичным антителам чрезвычайно гипериммунна и обладает высоким сродством к ним; 2) с каждой молекулой первичного антитела связываются две молекулы вторичных иммуноглобулинов, в результате чего значительно повышается чувствительность метода и можно использовать первичную антисыворотку в большем разведении; 3) все первичные антитела, выработанные у одного и того же вида животного к различным антигенам, могут быть выявлены с помощью одних и тех же меченных антител. Недостатки метода – большие затраты времени и возникновение дополнительной опасности неспецифических реакций.

В настоящее время методы ИГХ незаменимы в диагностике многих заболеваний и патологических процессов, в частности, являются «золотым стандартом» в морфологической диагностике опухолей. Определение гистогенеза опухоли с помощью ИГХ основано на фундаментальных свойствах опухолевого процесса, к которым относится сохранение экспрессии функционирующих генов (для ряда белков). Это проявляется в сходстве иммунофенотипа опухолевых клеток с их нормальными клеточными аналогами (рис. 41).

В то же время данный метод незаменим и при диагностике многих инфекционных и соматических заболеваний, в том числе заболеваний печени, почек, нервной системы, мышечных дистрофий и миопатий.

тий (рис. 42). ИГХ с использованием сыворотки больных широко применяется для диагностики аутоиммунных заболеваний, когда четко определяется к каким клеткам или клеточным структурам у больного вырабатываются антитела.

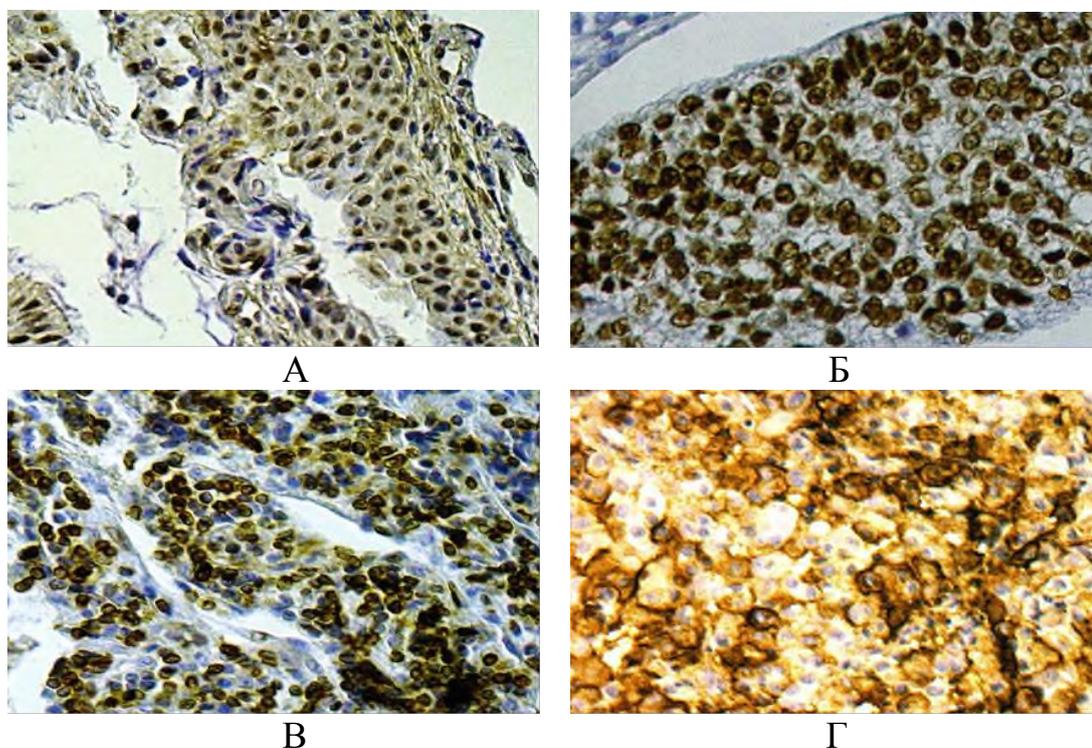


Рис. 40. Иммуногистохимические реакции при опухолях легких: А – положительная реакция с антигенами цитокератинов плоских эпителиев (плоскоклеточный рак); Б - положительная реакция с антигенами цитокератинов «простых» эпителиев (аденокарцинома); В - положительная реакция с хромогранинном (нейроэндокринный рак); Г - положительная реакция с мезотелиальным маркером HMVE-1 (мезотелиома) (по Edward C. Rlatt MD, 1999).

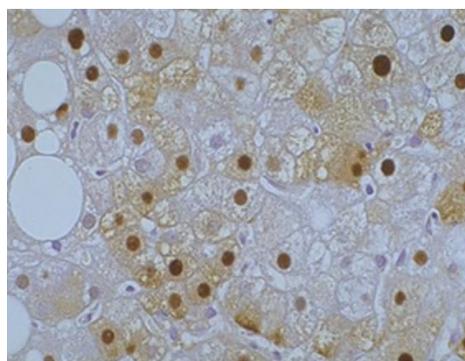


Рис. 42. Иммуногистохимические реакции: ткань печени, положительная реакция на сердцевинный (HB-core) антиген вируса гепатита В в ядрах гепатоцитов (по Edward C. Rlatt MD, 1999).

4.6. РАДИОАКТИВНАЯ МЕТКА

Радиоавтография (РАГ) – один из ведущих количественных методов изучения метаболических процессов, поскольку позволяет обходиться без нарушения целостности клеточных и тканевых структур. Он объединяет принципы морфологического и биохимического анализа, чем близок к гистохимическим методам исследования. Он позволяет визуально оценить, локализовать, наблюдать с помощью радиоактивных изотопов динамику биохимических процессов, протекающих в клетках и в субклеточных структурах, и изучать, таким образом, жизнедеятельность последних. Метод основан на введении в исследуемый объект радиоактивного метаболита («метки») и выявлении места его включения, путей перемещения в определённых структурах с помощью фотографической регистрации излучения.

Микроскопически данная методика применима как для световой, так и электронной микроскопии. Обычно для подобного рода исследований используют гистологические, цитологические препараты или однослойные культуры клеток. Способы введения меченых соединений в изучаемый объект зависят от задачи исследования и особенностей самого объекта и могут быть условно подразделены на три группы: введение (перорально или инъекционно) метки в целый организм; инкубирование тканей или клеток в растворе меченого соединения; обработка меченым соединением уже фиксированных препаратов. После обычных процедур фиксации, заливки и микротомии, полученные объекты (гистологические срезы, клеточные колонии, отдельные клетки) помещаются на предметное стекло, и на них наносится фотоэмульсия. Фотоэмульсия в микроскопической РАГ выполняет роль счетчика, в котором остается скрытое изображение в результате прохождения ионизирующей частицы, что позволяет с большой точностью локализовать радиоактивные распады атомов в изучаемом объекте. Это очень важно, когда необходимо выявить

включение меченых соединений в микроскопические объекты, такие как ядра клеток или отдельные хромосомы. Как правило, в биологических исследованиях применяют изотопы, испускающие частицы с низкой энергией (например, ^3H , ^{14}C , ^{35}S), что облегчает их регистрацию и локализацию с помощью высокочувствительной фотоэмульсии. После экспозиции препарата с фотоэмульсией в светонепроницаемых ящиках получившиеся автографы проявляют и закрепляют. Сами препараты подвергают соответствующим окраскам и световой микроскопии или электронной микроскопии с возможностью качественного и количественного анализа результатов (рис. 43).



Рис. 43. Схема радиавтографического метода. [meddr.ru].

Таким образом, РАГ представляет собой способ получения изображений (автографов) в результате воздействия на фотоэмульсию радиоактивного вещества, заключенного в объекте. Метод РАГ находит себе применение при изучении таких фундаментальных проблем, как индивидуальное развитие организмов, регенерация органов и тканей, злокаче-

ственный рост, функциональная морфология клеток, строение и функционирование клеточного ядра и хромосом (рис. 44).

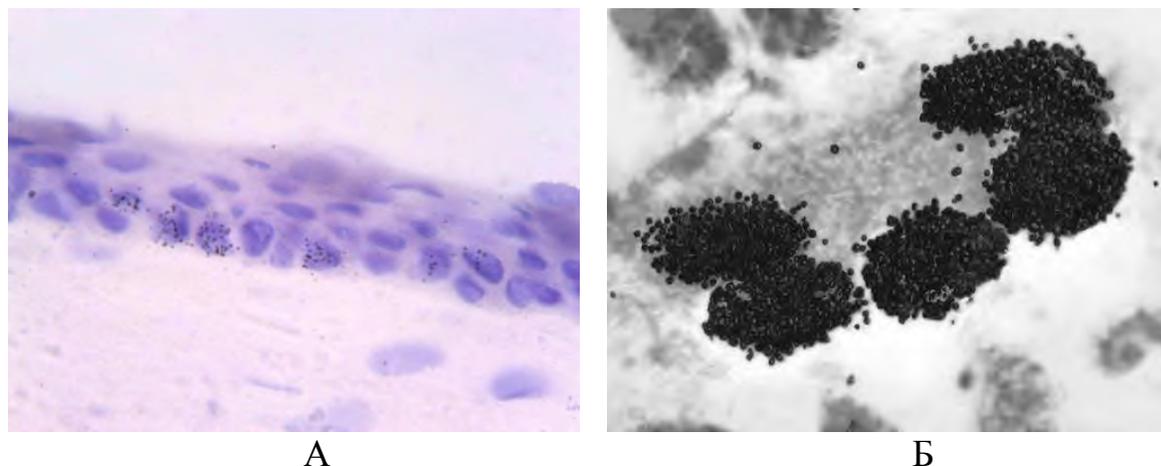


Рис. 44. Радиоавтография: А - роговица крысы, «метка» ^3H -тимидином в генеративной зоне, окраска гематоксилин-эозин; Б – фибробласт, включения в ядра меченного ^3H (тритием) тимидина, идущего на построение нуклеиновых кислот. [900igr.net].

В макроскопических исследованиях метод РАГ (сцинтирование) применяется достаточно редко и лишь по определенным показаниям, в специальных целях. При этом больному вводят радиоактивный органотропный изотоп, обладающий способностью концентрироваться в тканях определенного органа (^{131}I в щитовидной железе, ^{198}Au , ^{197}Hg в печени и др.). Сканирование позволяет определить смещение, увеличение или уменьшение размеров органа, а также изменение его функциональной активности (рис.45).

Сцинтиграфия при ДТЗ

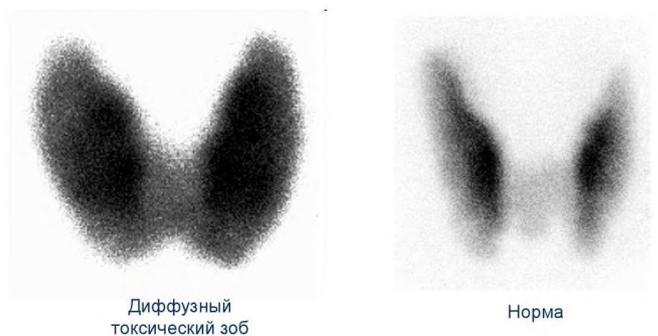


Рис. 45. РАГ в клинической практике – сцинтирование [en.ppt-online.org]

4.7. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Молекулярная биология - комплекс биологических наук, изучающих механизмы хранения, передачи и реализации генетической информации, строение и функции нерегулярных биополимеров (белков и нуклеиновых кислот).

Для решения диагностических задач в отношении функционирования клеточного генома (наличия в нем чужеродной ДНК и др.), исследуют хромосомы и применяют методы молекулярной биологии (генетика в морфологической диагностике на месте): хромосомный анализ, технику гибридизации *in situ* (метод прямого выявления нуклеиновых кислот в клеточных структурах при сохранении целостности структуры исследуемых объектов), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) *in situ*. Например, выявление в пораженных клетках встроенных ДНК вируса (вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса) при некоторых предопухолевых (дисплазия шейки матки, папилломатоз гортани) и опухолевых заболеваниях (рак шейки матки, гортани, назофарингеальный рак, некоторые виды лимфом) имеет важное значение для определения течения заболевания, выбора лечебной тактики и оценки прогноза.

С помощью *хромосомного анализа* выявляют дефекты генома клеток, как врожденного, так и приобретенного характера. Этот анализ особенно важен при распознавании опухолей, при которых можно наблюдать достаточно специфические маркерные перестройки или аберрации хромосом. Для этих целей используют клеточные культуры одного тканевого типа или даже моноклональные (т.е. линии, происходящей из одной стволовой клетки). Клетки культуры стимулируют к трансформации в бласты (менее зрелые формы, способные к активной пролиферации), а затем с помощью колхицина задерживают митозы на стадии метафазы (хромосомы в эту стадию как бы распластываются, что удобно для их изучения). После приготовления цитологического препарата и окраски в

каждой паре хромосом выявляются светлые (неокрашенные) и темные (окрашенные) участки (bands), поэтому метод получил название бэндинг. В нормальном кариотипе расположение этих полос высокоспецифично для каждой хромосомной пары, и существуют диаграммы (карты) бэндинга в норме. При патологии возникают aberrации как качественного, так и количественного характера, причем наблюдающиеся как внутри отдельных хромосом, так и межхромосомные (рис. 46).



Рис. 46. Карта бэндинга при синдроме Дауна. [900igr.net].

Техника *гибридизации in situ*, в отличие от ИГХ анализа, позволяющего локализовать белки внутри, на поверхности клеток и в межклеточном пространстве, способна морфологически продемонстрировать распределение специфических последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) в отдельных клетках на гистологических срезах, в цитологических мазках, клеточных культурах, хромосомных препаратах. В основе любой гибридизации лежит принцип специфического (комплементарного) взаимодействия меченого зонда (известного диагностического фрагмента нуклеиновой кислоты) с нуклеиновой кислотой-мишенью (исследуемого материала). Основные преимущества гибридизации *in situ* перед методом ИГХ: более высокая специфичность, ДНК не

чувствительны к фиксации формалином, гибрид зонд-мишень более стабилен, чем комплекс антиген-антитело, более широкий спектр зондов и простота их производства, позволяет проводить диагностику на молекулярном уровне. Проведение гибридизации *in situ* возможно на криостатных и парафиновых срезах тканей или цитологических мазках биопсийного или операционного материала. На срезы наносят меченые зонды, которые гибридизируют, при их наличии в образце, с комплементарными им ДНК. Гибридовавшиеся молекулы зонда выявляют с помощью соответствующих детекционных реагентов. Выбор того или иного варианта методики, зонда и детекционной системы определяется в зависимости от задач конкретного исследования. Для детекции меток используют метод автордиографии и нерадиоактивные зонды. В клинической практике к настоящему моменту наиболее широко используются два различных варианта гибридизации *in situ* с нерадиоактивными зондами: хромогенная, чаще всего с биотиновой меткой (CISH), традиционно применяемой в ИГХ, и флуоресцентная (FISH). Анализ полученных препаратов проводят в световом (при радиоактивной и красящей метке) или флуоресцентном (при мечении флуорохромами) микроскопе (рис. 47).

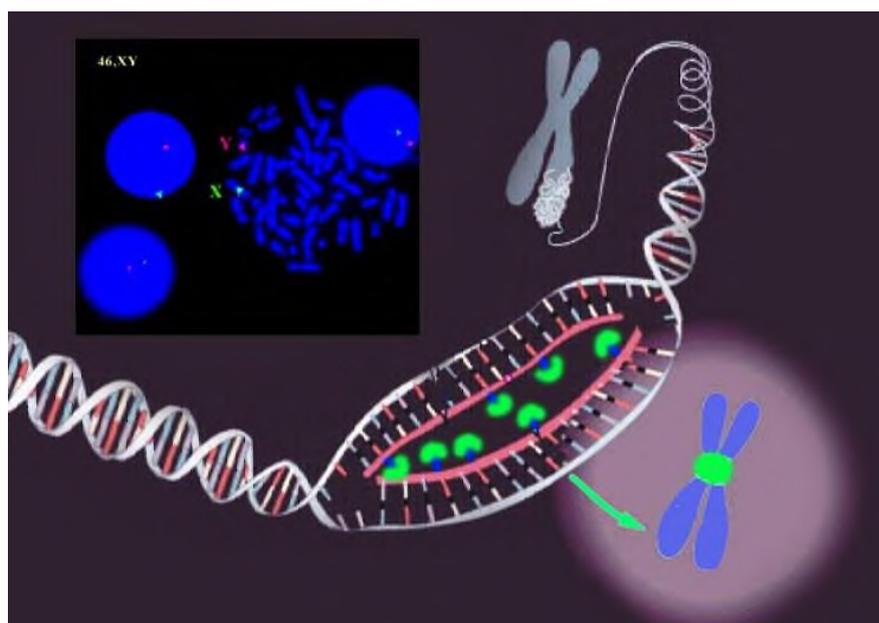


Рис.47. Схема флуоресцентной гибридизации *in situ* [900igr.net].

Результат можно подвергать как качественной, так и количественной оценке. Это позволяет судить о биосинтетической активности исследуемых клеток посредством их прямой визуализации. Данный метод широко используется в диагностике инфекционных и опухолевых заболеваний (определение онкогенов, генов-супрессоров, ростовых факторов и факторов, регулирующих клеточный цикл). Помимо этого, его можно применять для идентификации экспрессии РНК в опухолях эндокринных желез, негативных при иммуногистохимических реакциях. Недостатком метода гибридизации *in situ* является его относительно низкая чувствительность, что с успехом компенсируется при использовании ПЦР.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод молекулярной биологии, позволяющий значительно увеличивать малые концентрации определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале. Он был изобретен в 1983 году К. Муллисом (10 лет спустя был удостоен Нобелевской премии по химии (совместно с М. Смитом)). В основе метода лежит амплификация (многократное избирательное копирование) определенного участка ДНК в искусственных условиях при помощи соответствующих ферментов (ДНК-полимеразы). При этом копируется только тот участок ДНК, который соответствует заданным условиям, и только при его изначальном присутствии в исследуемом образце. Другими словами, ПЦР является процессом многократной искусственной репликации искомого фрагмента ДНК. ДНК-полимеразы не могут сформировать новую ДНК, имея в наличии лишь матрицу и мономеры, им нужна еще затравка (праймер), с которого и начинается синтез. В качестве праймера выступает короткий одноцепочечный фрагмент ДНК, который комплементарно располагается сбоку от основной цепи и таким образом отмечает заданную область в исследуемой молекуле. Процедура включает в себя серии повторных циклов, повторяемых до экспоненциального накопления специфического фрагмента ДНК. После 20 циклов количество копий (ампликонов) возрастает в 10^6 - 10^8 раз (рис. 48). В качестве

стартового материала при ПЦР может использоваться и РНК – эта методика обозначается как *ПЦР с обратной транскрипцией*. С ее помощью происходит построение комплементарной ДНК, которая определяется при ПЦР. На сегодняшний день методика ПЦР получила дальнейшее развитие в виде *ПЦР в реальном времени*, которая позволяет давать количественную оценку исследуемых нуклеиновых кислот. Кроме того, известна техника *ПЦР in situ*, которая объединила в себе высокую чувствительность ПЦР и клеточную локализацию нуклеиновых кислот. Данный метод проводится в несколько этапов: подготовка биологического материала (гистологические и цитологические препараты), амплификация *in situ* и обнаружение внутриклеточных продуктов ПЦР. Обнаружение ампликонов внутри клеток может проводиться двумя способами: при помощи гибридизации *in situ* (непрямая ПЦР *in situ*, более сложная, максимальная специфичность), с помощью непосредственного обнаружения меченых нуклеотидов, включенных в ампликоны во время терминальных циклов (прямая ПЦР *in situ*, ускоренный вариант). Наиболее часто эту технику используют для выявления таких сложных в диагностике объектов, как некультивируемые вирусы с крайне низкой степенью репликации (вирус гепатита С) прямо на гистологических срезах.

Полимеразная цепная реакция - ПЦР

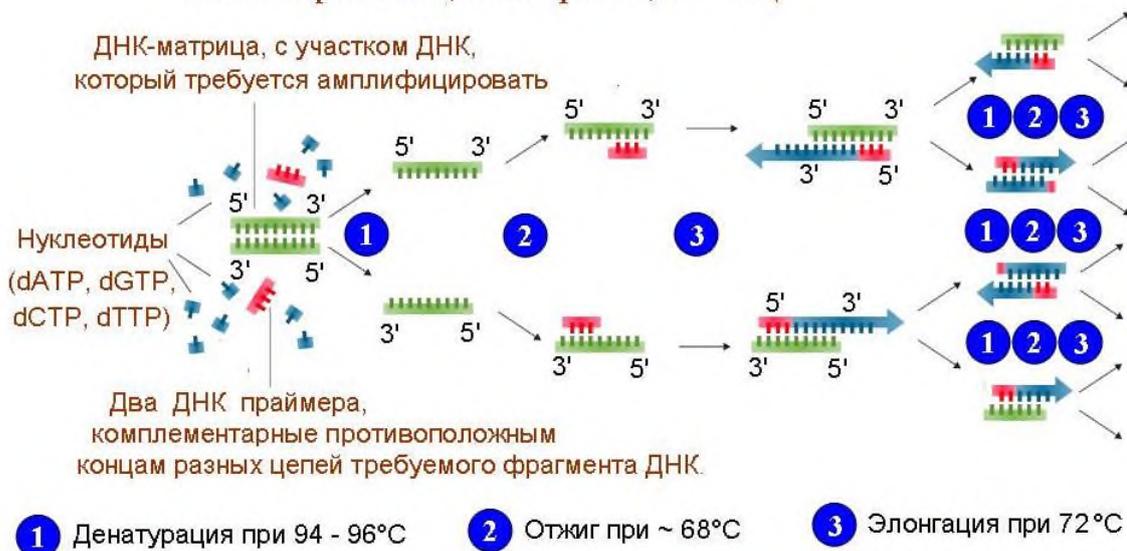


Рис. 48. Схема полимеразной цепной реакции. [gerpes.guru]

ГЛАВА 5. ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИЙ ИНСТРУМЕНТАРИЙ

5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ, НОМЕНКЛАТУРА, ИСТОРИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ

Патологоанатомический инструментарий (ПИ) – набор медицинских инструментов, используемых в основном при посмертном морфологическом исследовании во время аутопсии. В то же время, отдельными инструментами пользуются и при подготовке материала (вырезка) для прижизненного морфологического исследования.

В настоящее время существует достаточно большое количество классификаций медицинского, в том числе ПИ и вариантов деления его на группы.

Различают собственно инструменты и патологоанатомические аппараты. К первым относят в основном однодетальные (как правило, цельнокованные или штампованные - скальпели, долота), двух- или несколько детальные сложные изделия, чаще металлические, которыми патологоанатом работает вручную (ножницы). Патологоанатомические аппараты – это сложные устройства, механизированные, которые могут быть оснащены электрическими и пневматическими приводами. Например, электрические приборы для распила костей – дисковая электропила, весы.

Наименования ПИ указывают на их функциональное назначение. Преимущественно используют общепринятые в практике патологоанатомов всех стран названиями, заимствованными из латинского, древнегреческого или других языков: скальпель, миелотом, пинцет и др. Многие инструменты называют одновременно и русскими, и иностранными словами: клемма или зажим, дилататор или расширитель; леватор или подъемник. В ПА, как и в хирургических специальностях, принято наимено-

вания инструментов дополнять фамилиями их изобретателей, например пинцет Шора, крючки Фолькмана. В тоже время, малый зубчато-лапчатый пинцет, предложенный русским гинекологом Д. О. Оттом, за рубежом называют «русским пинцетом».

Известно, что для любой области практической деятельности человека характерен свой путь исторического развития. По происхождению основная масса ПИ заимствована из клинической медицины, в основном из хирургии, но по мере оформления патологической анатомии в отдельную специальность появились и «свои» уникальные образцы. Это пинцет Шора, двойная пила Люэра, рахиотом Гелли, мозговой нож Вирхова, мизотом Пика и др. Интересно, что в тот период производили одновременно и функциональные, и весьма красивые инструменты. Внешне нередко они походили на сувениры (рис. 49). Однако, спустя некоторое время главными достоинствами в изготовлении медицинских инструментов стали *функциональность* и *качество*, критерий красоты ушел на второй план.



Рис. 49. Набор патологоанатомических инструментов (фото из коллекции музея Виктории в Австралии, 1900г.) [collections.museumvictoria.com.au].

Современный ПИ создается с соблюдением некоторых важных правил. Материал, из которого сделан инструмент, должен быть твердым, гладким, лучше полированным; не должен изменяться под влиянием воздействий, применяемых для его стерилизации; не должен подвергаться коррозии; должен состоять из одного элемента или малого числа деталей без скрытых винтов, шарниров и прочих трудно очищаемых деталей, и разбираться без дополнительных инструментов. Все режущие инструменты не должны иметь колющих, травмирующих ткани острых краев, углов, поэтому концы должны быть закругленными. Для вскрытия в этом нет никакой необходимости, а колющими инструментами патологоанатом может случайно пораниться.

По функциональному принципу ПИ классифицируются на общие патологоанатомические и специальные.

5.2. ОБЩИЕ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИЕ ИНСТРУМЕНТЫ

Общие патологоанатомические инструменты - это инструменты, наиболее часто применяемые и используемые для основных манипуляций. Довольно часто эти инструменты являются многофункциональными и в свою очередь могут быть разделены на 4 подгруппы в зависимости от своего конкретного назначения (рис.50).

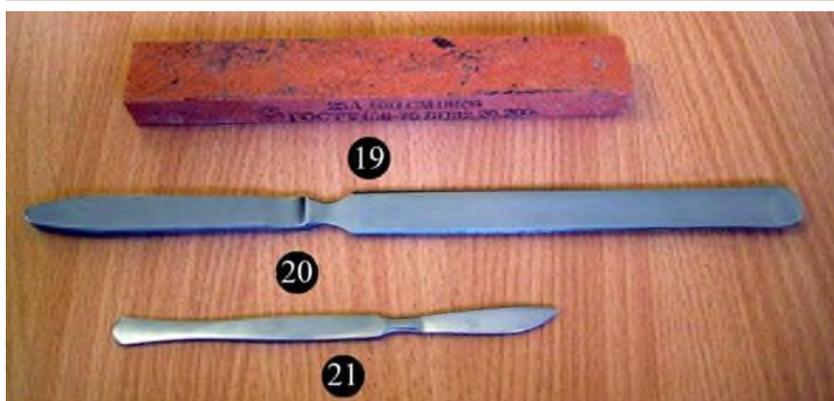
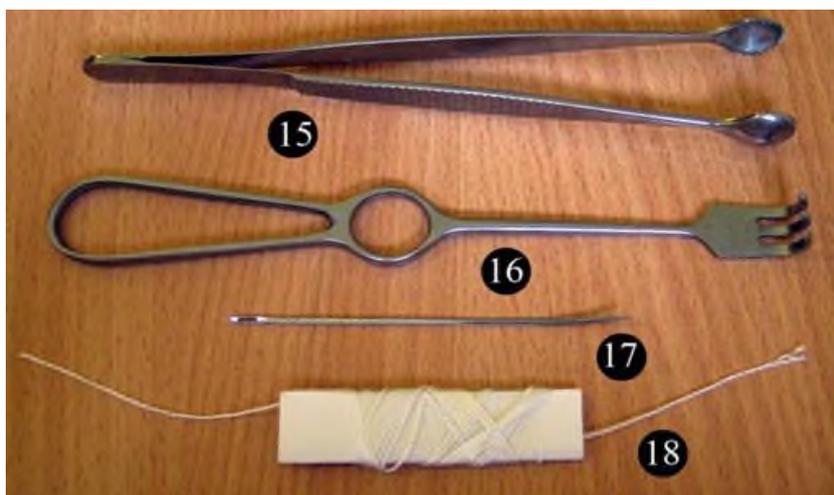
1. ПИ для разъединения (и иссечения) тканей - ножи, скальпели, ножницы, долота, пилы, миелотомы, щипцы-кусачки и др.

Нож малый секционный (ампутационный) с толстой спинкой и брюшистым лезвием применяют при разрезании кожи, рассечении диафрагмы полости рта, при эвисцерации органокомплекса (рис. 50(2)).

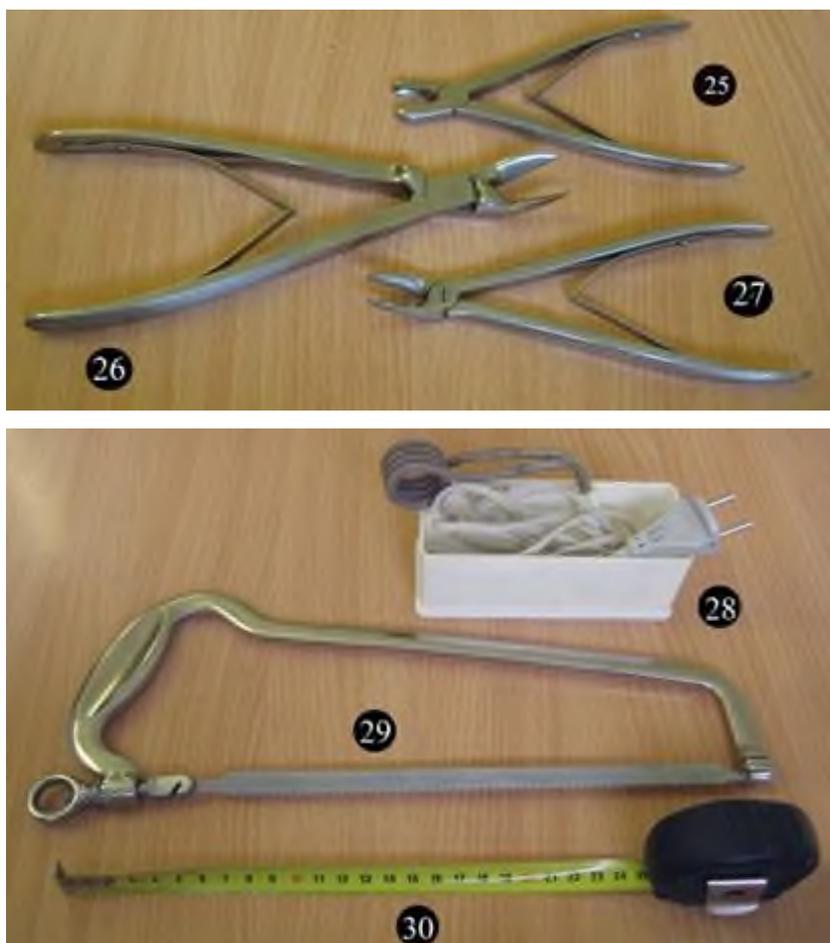
Нож большой секционный (ампутационный) с толстой спинкой и брюшистым лезвием и большей чем предыдущий длиной используют для разрезов органов эвисцерированного органокомплекса: печени, почек,



Рис. 50. Патологоанатомический инструментарий: 1 – ножи ампутационный большой; 2 – малый; 3 – хрящевой реберный; 4 – ножницы анатомические кишечные; 5 – с одним острым концом, прямые; 6 – глазные вертикально-изогнутые, остроконечные; 7 – пила листовая ампутационная Шарье; 8– долото с граненой ручкой с односторонней заточкой; 9– молоток с крючком (маллет); 10 – ложка измерительная для жидкости; 11 – линейка металлическая; 12 – зонд патологоанатомический с делениями; 13 – зонд хирургический желобоватый; 14 – зонд хирургический пуговчатый.



Продолжение Рис. 50. 15 – пинцет зубчато-лапчатый большой (Шора); 16 – крючок (ретрактор) хирургический, трехзубый, острый; 17 – игла анатомическая с изогнутым концом и трехгранным острием; 18 – шовный материал (нити суровые льняные); 19 – брусок шлифовальный; 20 – нож мозговой Виrhoва; 21 – скальпель брюшистый большой; 22 – пинцет анатомический общего назначения большой; 23 – пинцет зубчато-лапчатый малый (Отто); 24 – пинцет анатомический общего назначения малый.



Продолжение Рис. 50. 25 – щипцы-кусачки костные с круглыми губками прямыми; 26 – кусачки костные типа Листона с удлиненными ручками; 27 – с короткими ручками (27); 28 – кипятильник дезинфекционный; 29 – пила рамочная; 30 – рулетка измерительная металлическая.

легких, других органов, в том числе головного мозга (см. рис. 50(1)). Однако в состав ПИ входит и специальный *мозговой нож Вирхова* (см. рис. 50(20)). Он имеет обоюдоострое лезвие длиной в 25см и шириной в 4см и используется для проведения широких разрезов через органы, особенно через мозг.

Нож реберный (хрящевой) более короткий с прочным брюшистым лезвием служит для рассечения хрящевых частей ребер и пересечения I ребра (см. рис. 50(3)).

Миелотом Пика - нож с длинной тонкой ручкой и лезвием, имеющий вид узкой лопаточки длиной 1,5см, отогнутой под углом 100°, служит для пересечения спинного мозга при изъятии из полости черепа головного мозга.

Скальпель (лат. «ножичек») - небольшой однодетальный инструмент с коротким лезвием и длинной рукояткой предназначен для тонкой препаровки и рассечения мягких тканей. Выделяют несколько видов скальпелей: *брюшистый*, *остроконечный*, *глазной*, *ланцет*, в патолого-анатомической практике целесообразно использовать первый (см. рис. 50(21)).

Большую часть разрезов при вскрытии производят секционными ножами. Нож при этом держат за ручку всей ладонью, захватывая ее сверху (рис. 51), режет в положении смычка для скрипки. Препаровку тканей удобнее производить с помощью скальпеля, держа его, как писчее перо. Ножи всегда должны быть острыми. В таких условиях каждое движение без всякого усилия и давления дает достаточно глубокий и широкий разрез, а поверхности разреза получаются ровные без повреждения органа. Режущие движения должны быть уверенными, свободными, широкими, причем единичными, а не множественными; пилящие движения недопустимы. При уменьшении количества ненужных действий снижается и вероятность нанесения себе травмы.

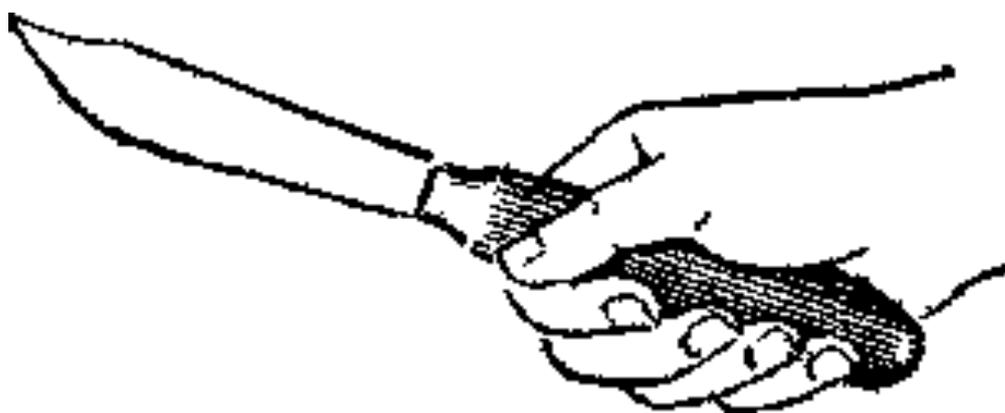


Рис. 51. Положение ножа в руке (по И.И. Медведеву, 1969г.).

Ножницы - являются сборным инструментом. Они состоят из рабочей части (лезвий) и рукояток, соединенных винтом или заклепкой. Кромки лезвий, смыкаясь, обеспечивают разрезание тканей. Ножницы могут быть прямыми, изогнутыми по плоскости или под углом. Кроме

того, бывают ножницы тупоконечные и остроконечные. Маленькие ножницы как прямые, так и изогнутые называются глазными. Применение ножниц зависит от их формы, так как ножницы, кроме резания, производят еще и нежелательное раздавливание тканей. Их применяют там, где по каким-либо причинам невозможно использование скальпеля (например, при разрезании ненатянутых тканей или когда необходимо сделать разрез на определенную глубину, не затрагивая подлежащие слои). *Кишечные* ножницы с утолщением на конце одной из бранш применяются для вскрытия тонкого и толстого кишечника, *тупоконечные* – для вскрытия сердца, аорты и ее крупных ветвей, дыхательных путей, пищевода и желудка, влагалища и мочевого пузыря, а также для рассечения связок и препаровки, *остроконечные* ножницы – для вскрытия протоков и мелких сосудов (см. рис. 50(4;5;6)).

Ножницы при проведении морфологических исследований надлежит держать следующим образом: большой палец и четвертый (безымянный) вводят в верхнее кольцо и в нижнее кольца соответственно, а указательным и средним пальцами помогают фиксировать ножницы (рис. 52.).

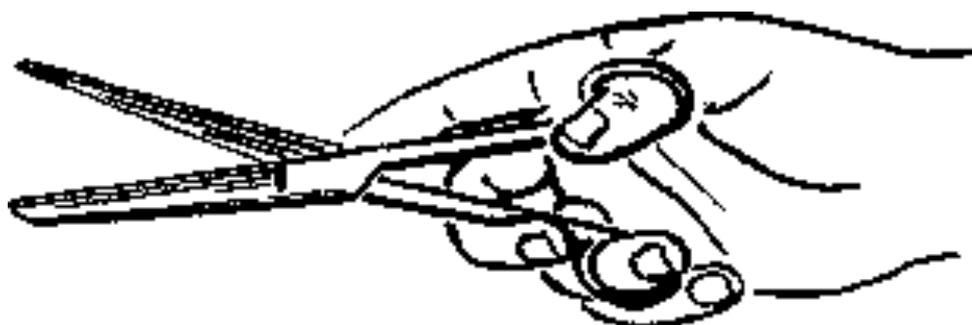


Рис. 52. Положение ножниц в руке (по И.И. Медведеву, 1969г.).

Долота являются цельноковаными или штампованными однодетальными инструментами (см. рис. 50(8)). Они состоят из заостренной рабочей части (прямой или изогнутой) и рукоятки. Для долота характерна прямая рукоять простой формы с уплощением на конце («пятка», или ударная часть). Предназначены эти инструменты для обработки кости:

при помощи долота и молотка врач рассекает или надсекает кость. Наиболее крупные и прочные долота также называются остеотомами.

Пилой анатомической (медицинской) листовой пользуются для распила костей, в том числе позвоночника и черепа (см. рис. 50(7)), для этих целей применяют также *дуговую (рамочную) пилу* (см. рис. 50(29)). Пила двойная Люера (рахиотом Люера) состоит из двух параллельных листовых пил, служит для перепиливания дужек позвонков при вскрытии позвоночника (рис. 53).

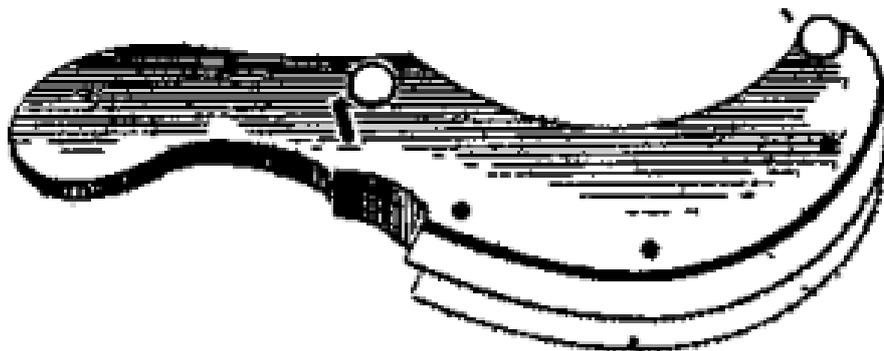


Рис. 53. Пила Люера. (по И.И. Медведеву, 1969г.).

Медицинские кусачки необходимы для разъединения твердых тканей (хрящей и костей), их конструкция помогает существенно облегчить работу патологоанатому (*кусачки Листона с длинными и короткими ручками, щипцы-кусачки костные с круглыми губками прямые* (см. рис. 50(25;26;27)). Рахиотом Гелли – вид кусачек по типу костных ножниц с короткими клювовидными браншами и длинными ручками, специально применяется для перекусывания задних дужек позвонков.

2. ПИ для фиксации тканей, создания экспозиции – крючки, пинцеты, зажимы, зонды, зеркала, ранорасширители и др.

Крючки - инструменты, удерживающие ткани, могут быть односторонними и двусторонними. Односторонние крючки состоят из рукоятки и рабочей части. Примером их являются *трехзубый и четырехзубый хирургические крючки Фолькмана* (см. рис. 50(16)).

Пинцеты (фр. «щипчики») - это древнейшее, изначально совсем не медицинское изобретение человека, придуманное для манипуляций с мелкими предметами, которые неудобно (или невозможно) взять руками. Двухдетальные инструменты с пружинящими рабочими частями предназначены для захвата и удерживания тканей, органов. Анатомический пинцет отличается более нежным, но при этом и менее прочным захватом – им удерживают легкоранимые анатомические образования (см. рис. 50(22)). Хирургический пинцет имеет на рабочей поверхности зубцы, которые травмируют ткани, но зато очень крепко их захватывают (см. рис. 50(24)). Глазной пинцет отличается меньшими размерами, может применяться при небольших манипуляциях. В патологоанатомической практике большее применение нашли зубчато-лапчатые пинцеты малый («русский» пинцет Отто (см. рис. 50(23)) и большой пинцет Шора, захватывающие части которого имеют вид зубчатых ложек (см. рис. 50(15)).

Зажимы - это специальные медицинские инструменты, используемые для зажатия ткани, материала. В патологоанатомической практике используются редко. По конструкции они очень похожи на обычные ножницы только без режущей части и с фиксирующим элементом (кремальера).

Зонд (франц. посылать) – медицинский инструмент в виде тонкого стержня. С его помощью проводят диагностические или лечебные процедуры в различных каналах и полостях человеческого тела. *Желобоватый зонд* (см. рис. 50(13)) используется при рассечении фасции или апоневроза для предохранения подлежащих тканей от повреждения, им удобно пользоваться при вскрытии узких каналов, протоков. Главным назначением *пуговчатого зонда* (см. рис. 50(14)) является ревизия свищевых ходов. В отличие от первых двух *патологоанатомический зонд* имеет большую длину, на его поверхности нанесены деления, и используется он не толь-

ко для ревизии патологических ходов, но и одновременного измерения их длины (см. рис. 50(12))

3. ПИ для визуализации, измерения, аспирации: лупа, рулетка, линейка, ложки-черпаки, шприцы различной емкости, измерительные цилиндры, измерительный циркуль и др.

Лупа позволяет расширить возможности макроскопического исследования во время вскрытия или вырезки биопсийного и операционного материалов.

Линейка (см. рис. 50(11)) и *рулетка* (см. рис. 50(62)) используются для определения размеров соответственно малых (киста, опухоль) и крупных (рост умершего) объектов.

Ложки-черпаки дают возможность не только извлечь жидкость из полостей, но и измерить ее объем (см. рис. 50(10)).

Шприцы различных объемов применяются для аспирации жидкого содержимого, в качестве насоса для нагнетания воздуха или жидкости при проверке проходимости полых структур, состоятельности швов, наличия перфораций и др.

4. ПИ для соединения тканей - иглы с иглодержателями, шовный материал, приспособления для проволочных металлических швов. Основное назначение инструментов данной подгруппы – восстановление целостности рассеченных структур, кожных покровов и должного внешнего вида трупу после вскрытия.

Иглодержатель - это специальный вид медицинского инструментария, позволяет фиксировать иглу и манипулировать ею при наложении швов на ткани.

5. ПИ вспомогательный, не входящий в непосредственное соприкосновение с исследуемыми тканями.

Патологоанатомический молоток с крючком (маллет) используют вместе с долотом при исследовании костного скелета, вскрытии позво-

ночного канала, полостей черепа. Для отделения спиленной крышки черепа удобны молотки с загнутой на конце ручкой (см. рис. 50(9)).

С помощью *шлифовального бруска* поддерживается острота режущей части инструментов (см. рис. 50(19)).

Кипятильник дезинфекционный используют для обработки ПИ после вскрытия (в настоящее время используется редко) (см. рис. 50(28)).

Средства безопасности персонала. Производственная одежда должна обеспечивать надежную защиту патологоанатома во время вскрытия трупа. Поверх обычного халата (хирургического костюма) надевают хирургический халат с запахом и рукавами на резинке, передник-фартук из водонепроницаемого материала, на голову – полотняную шапочку (чепчик) или марлевую косынку, маску, очки или экран пластиковый, прозрачный для защиты лица, на предплечья - нарукавники из водонепроницаемого материала, на кисти рук - резиновые перчатки, для лучшей защиты от порезов и уколов используют перчатки тканые, прорезиненные или перчатки из стальной кольчуги (рис. 54).



Рис. 54. Средства безопасности персонала: 1 – экран пластиковый, прозрачный для защиты лица; 2 – шапочка-шлем; 3 – маска; 4 – халат с запахом и рукавами на резинке; 5 – нарукавники; 6 – перчатки анатомические, резиновые; 7 – фартук; 8 – брюки хирургические; 9 – бахилы; 10 – перчатки, тканые, прорезиненные, предохраняющие от порезов; 11 – перчатки из стальной кольчуги.

Ноги обувают в галоши или резиновые сапоги, возможно бахилы. При вскрытии умерших от инфекционных заболеваний, в частности особо опасных инфекций, прозектор и присутствующие на вскрытии должны быть одеты в специальную защитную одежду, предусмотренную соответствующими инструкциями.

Перед применением ПИ необходимо освоить функциональное назначение каждого инструмента, правила его выбора, знать оптимальные позиции инструмента в руке, возможные риски при использовании.

Весь ПИ объединяется в специальные наборы. Состав наборов несколько варьирует в зависимости от медицинского учреждения, поставщика, фирмы-изготовителя (рис. 55) и т.д. Иногда на формирование набора влияет также и привычка самого врача-патологоанатома. В связи с этим целесообразно выделять базовую часть набора и дополнительную, соответственно малый и большой секционные наборы (таб. 2).

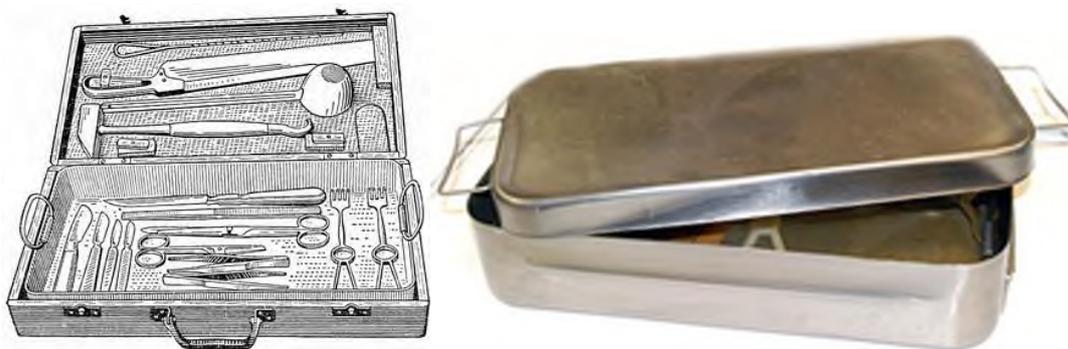


Рис. 55. Ящик с секционным набором [medical-enc.ru].

ПИ хранят в сухих отапливаемых помещениях при комнатной температуре в шкафах или специальных ящиках с раскладкой по виду и назначению. Ножи и скальпели располагаются на подставках, чтобы лезвия находились на весу. Перед вскрытием ПИ раскладывается на препаровочном столике или секционном столе у ног трупа. При вскрытии обычно используют ограниченный, но достаточный для обычного вскрытия набор инструментов (без которых невозможно или очень трудно обойтись). Однако для детальной патологоанатомической экспертизы, в

том числе с целью научного исследования, необходим широкий набор инструментов. При необходимости врачу подают другие инструменты, а по завершению их использования убирают со стола.

Таблица. 2

**Перечень современного патологоанатомического инструментария,
составляющего малый и большой секционные наборы**

Название инструмента		Малый секционный набор	Большой секционный набор
1.	Нож ампутационный большой		
2.	Нож ампутационный малый		
3.	Нож хрящевой реберный		
4.	Ножницы анатомические кишечные, прямые		
5.	Ножницы с одним острым концом, прямые		
6.	Ножницы глазные вертикально-изогнутые, остроконечные		
7.	Пила листовая ампутационная Шарье		
8.	Долото плоское, с граненой ручкой с односторонней заточкой		
9.	Молоток с крючком (маллет)		
10.	Ложка измерительная для жидкости		
11.	Линейка металлическая – 300 мм		
12.	Зонд анатомический трупный с делениями		
13.	Зонд хирургический желобоватый, 170мм		
14.	Зонд хирургический пуговчатый, двухсторонний		
15.	Пинцет зубчато-лапчатый большой (Шора)		
16.	Крючок (ретрактор) хирургический, трехзубый, острый		
17.	Игла анатомическая с изогнутым концом и трехгранным острием		
18.	Шовный материал (нити суровые льняные)		
19.	Брусок шлифовальный		
20.	Нож мозговой Вирхова		
21.	Скальпель брюшистый большой		
22.	Пинцет анатомический общего назначения большой		
23.	Пинцет зубчато-лапчатый малый (Отто)		
24.	Пинцет анатомический общего назначения малый		
25.	Щипцы-кусачки костные с круглыми губками прямые		
26.	Кусачки костные типа Листона с удлиненными ручками		
27.	Кусачки костные типа Листона с короткими ручками		
28.	Кипятильник дезинфекционный		
29.	Пила рамочная		
30.	Рулетка измерительная металлическая		

5.3. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИЕ ИНСТРУМЕНТЫ

Специальные патологоанатомические инструменты разработаны и используют для осуществления какого-либо одного конкретного оперативного приема, которые применяются только в отдельных областях патологической анатомии.

Примерами таких инструментов может быть набор, разработанный на кафедре патологической анатомии БГМУ, используемый при малоинвазивной аутопсии. Для проведения патологоанатомического вскрытия с применением малоинвазивных технологии предложено и запатентовано 9 инструментов, разработаны методические рекомендации «Совершенствование техники аутопсии с применением малотравматичной технологии» (рис. 56). Предложенный инструментарий дополняет обычный секционный набор.



Рис. 56. Патенты РФ на изобретение, на полезные модели, методические рекомендации «Совершенствование техники аутопсии с применением малотравматичной технологии».

Полную эвисцерацию при патологоанатомическом исследовании с применением малоинвазивной технологии осуществляют следующим образом. При извлечении органов шеи, грудной полости и брюшной полости, органов забрюшинной локализации используют верхнесрединный

лапаротомный доступ, когда осуществляют разрез кожи и подлежащих тканей от мечевидного отростка грудины до пупка с обнажением брюшной полости. Выполнение данного этапа позволяет извлечь кишечник вместе с селезенкой единым блоком.

Таблица 3

**Набор инструментов для аутопсий с применением
малоинвазивных технологий**

№	Название инструмента
1.	Устройство для захвата мягких тканей шеи и извлечения органов шеи
2.	Устройство для захвата надгортанника (трахеи) и извлечения органов шеи
3.	Устройство для захвата и выделения органов шеи от шейного отдела позвоночника
4.	Устройство для выделения мягких тканей шеи от шейного отдела позвоночника (изогнутое)
5.	Устройство для пересечения сосудисто-нервного пучка шеи
6.	Устройство для выделения мышц диафрагмы рта (прямое)
7.	Устройство для выделения мышц диафрагмы рта (изогнутое)
8.	Устройство для подъема реберной дуги (большое)
9.	Устройства для подъема реберной дуги (малое)

Далее средним ампутационным ножом отделяют от ребер левую и правую половину диафрагмы до их ножек, что позволяет отвести ее книзу. Затем поверхность перикарда отделяют от задней поверхности грудины с помощью длинного ампутационного ножа. Для достижения оптимального подхода к органам грудной полости и шеи через верхне-срединный лапаротомный доступ используют устройство, поднимающее реберную дугу (рис.57). Путем вращения против часовой стрелке двух винтов с гайками из положения «минимум» осуществляется подъем реберной дуги до возможного уровня «максимум». В этих условиях значительно увеличивается площадь обзора полости грудной клетки и органов шеи. Всё это обеспечивает большую зону доступности, повышение угла операционного действия и свободы манипуляций при полной эвисцерации.

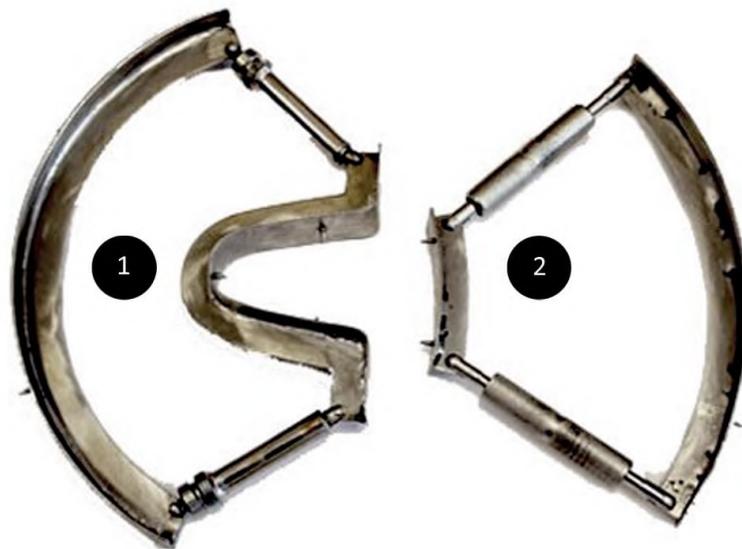


Рис. 57. Устройство для подъема реберной дуги: 1 – большое; 2 – малое.

Затем в области шеи по срединной линии выполняют разрез длиной 3 – 4 см кожи и подлежащих тканей до обнажения трахеи, создают кожно-подкожный лоскут по обе стороны от срединного доступа и формируют подкожный туннель. Через шейный разрез подводят устройство для выделения мышц диафрагмы рта, содержащее лезвие, стержень, рукоятку, которое по периметру заточено и прикреплено к стержню горизонтально или под прямым углом (рис. 58(2)). Примечательно, стержень имеет разную длину в зависимости от антропометрических особенностей грудной клетки и шеи трупа. Данное устройство извлекают и заменяют другим, в котором лезвие припаяно к стержню под прямым углом (рис. 58(3)). Это позволяет завершить рассечение тканей дна рта и выделить органы шеи единым блоком.

Для облегчения выделения мягких тканей с поверхности шейных позвонков производят захват надгортанника (трахеи) специальным устройством (рис. 59(2)). Предлагаемое устройство содержит: рукоятку, стержень, багорик, который выполнен постепенно нарастающим в периметре до образования полукруга и переходящего в стержень. Дли-

на стержня учитывает антропометрические данные грудной клетки и шеи трупа.

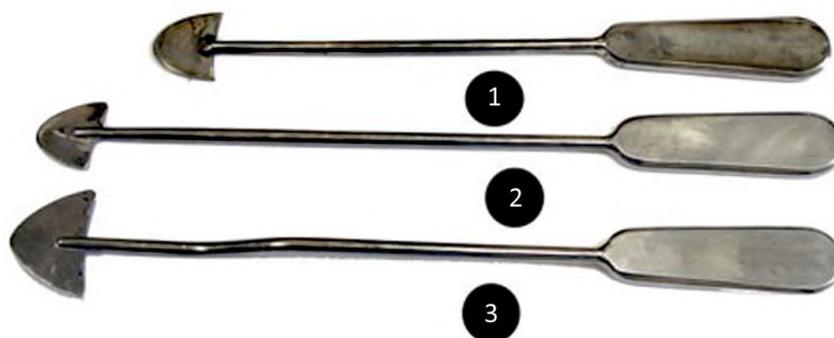


Рис. 58. 1 – Устройство для пересечения сосудисто-нервного пучка шеи; 2 – устройство для выделения мышц диафрагмы рта (прямое); 3 – устройство для выделения мышц диафрагмы рта (изогнутое).

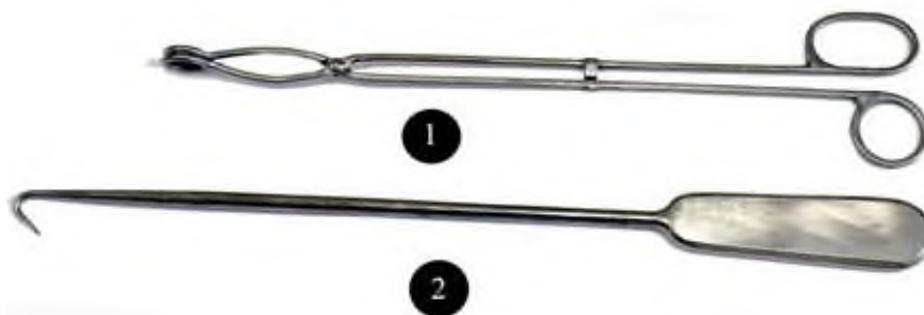


Рис. 59. 1 – устройство для захвата мягких тканей шеи и извлечения органов шеи; 2 – устройство для захвата надгортанника (трахеи) и извлечения органов шеи.

На следующем этапе используют устройство для пересечения сосудисто-нервного пучка шеи, которое в рану подводят через доступ в области шеи. Устройство содержит заточенное лезвие пикообразной формы, стержень, рукоятку. Стержень имеет тупой угол наклона и разную длину, позволяющую учитывать антропометрические особенности трупа (см. рис. 58(1)).

Устройство для захвата и выделения органов шеи от шейного отдела позвоночника имеет форму «кобры» за счет тупого угла наклона стержня и пилообразной конфигурации лезвия. Стержень имеет разную

длину с учетом антропометрических особенностей грудной клетки и шеи трупа. Эти особенности ножа и наличие кожно-подкожного туннеля в области шеи обеспечивают свободную манипуляцию и анатомичное выделение органов шеи (рис. 60(1)).

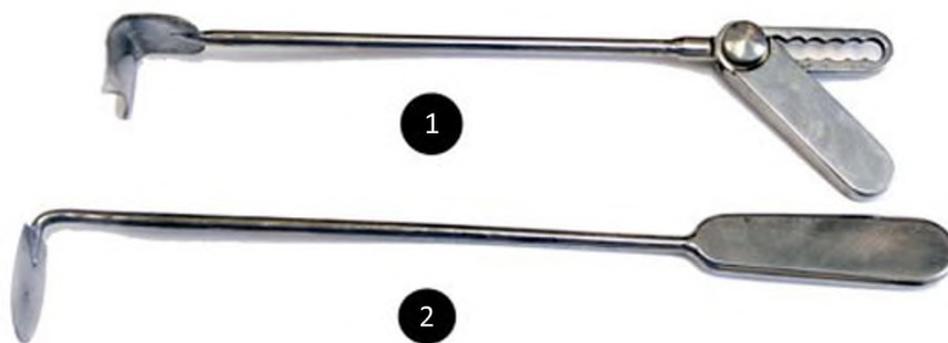


Рис. 60. 1 – устройство для захвата и выделения органов шеи от шейного отдела позвоночника; 4 – устройство для выделения мягких тканей шеи от шейного отдела позвоночника.

На следующем этапе через лапаротомное окно в грудную полость вводят устройство для захвата мягких тканей шеи и извлечения органов шеи (см. рис. 59(1)). Прижимы имеют достаточную длину, учитывающую антропометрические особенности грудной клетки и шеи трупа. Устройство располагают в начальном отделе грудных позвонков, левой рукой осторожно осуществляют тракцию мягких тканей книзу и кпереди с помощью зажимов устройства, а правой рукой устройством для выделения органов шеи пересекают оставшиеся соединительнотканые образования с поверхности тел грудных позвонков (см. рис. 60(2)). По окончании всех этапов выделения органокомплекса удаляют все использованные устройства. В конце исследовательской работы из брюшной полости извлекают устройство, с помощью которого была приподнята реберная дуга грудной стенки.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1.** Сущность морфологических методов.
- 2.** Принципы классификации морфологических методов.
- 3.** Материалы морфологического исследования.
- 4.** Объекты морфологического исследования.
- 5.** Характеристика макроморфологического метода.
- 6.** Виды микроскопических методов исследования.
- 7.** Витальная микроскопия.
- 8.** Базовая и селективная гистологическая окраска.
- 9.** Цитологические методы исследования.
- 10.** Иммуноморфологические методы и область их применения.
- 11.** Характеристика методов молекулярной биологии в морфологии.
- 12.** Патологоанатомический инструментарий: виды, назначение.
- 13.** Техника патологоанатомического вскрытия.
- 14.** Специальные приемы патологоанатомического вскрытия.
- 15.** Малоинвазивная технология аутопсии: инструменты и техника.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Решение тестовых заданий направлены на формирование общепрофессиональных и профессиональных компетенций ОПК-9, ПК-5, ПК-6.

Выберите один правильный ответ

1. ОКРАСКА ПИКРОФУКСИНОМ ПО ВАН ГИЗОНУ ИЗБИРАТЕЛЬНО ВЫЯВЛЯЕТ

- а) слизь
- б) коллагеновые волокна соединительной ткани
- в) жир
- г) амилоид

2. ПРИ ПЛАНОВОЙ БИОПСИИ ОТВЕТ ПОЛУЧАЮТ ЧЕРЕЗ

- а) 1-20 суток
- б) 4 рабочих дня
- в) 20-25 минут
- г) 1-5 часов

3. ПРИ СРОЧНОЙ БИОПСИИ ОТВЕТ ПОЛУЧАЮТ ЧЕРЕЗ

- а) 1-2 суток
- б) 1-5 часов
- в) 20 минут

4. ПО КАЖДОМУ СЛУЧАЮ КОЛИЧЕСТВО МИКРОПРЕПАРАТОВ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ

- а) лаборантом-гистологом
- б) заведующим патологоанатомическим отделением
- в) патологоанатомом, производящим вырезку
- г) лечащим врачом

5. СООТНОШЕНИЕ МАССЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЪЕКТА И ФИКСАТОРА ДОЛЖНО СОСТАВЛЯТЬ

- а) 10:1
- б) 1:10

в) 1:1

г) 2:1

6. МЕТОД ОКРАСКИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ВЫБИРАЕТ

а) патологоанатом, производящий вырезку

б) лечащий врач

в) лаборант-гистолог

7. ОРИЕНТИРОВОЧНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

а) описывает все общепатологические процессы

б) устанавливает конкретную нозологическую единицу

в) определяет круг заболеваний в диагностике

8. ОКОНЧАТЕЛЬНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

а) устанавливает конкретную нозологическую единицу

б) определяет круг заболеваний в диагностике

в) описывает общепатологические процессы

9. ОПИСАТЕЛЬНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

а. описывает общепатологические процессы

б. устанавливает конкретную нозологическую единицу

в. определяет круг заболеваний в диагностике

Выберите несколько правильных ответов

10. БИОПСИЙНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИСЫЛАЮТ ПАТОЛОГОАНАТОМУ:

а) в формалине

б) в спирте

в) в изотоническом растворе

г) замороженным

11. БАЗОФИЛЬНЫМИ СТРУКТУРАМИ В ТКАНЯХ ЯВЛЯЮТСЯ:

а) ядра клеток

б) соли кальция

в) эритроциты

г) цитоплазма

12. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ НЕОБХОДИМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ

- а) вирусов
- б) имфоцитов
- в) ктерий
- г) иммунных комплексов

13. ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ ДНК ПОЗВОЛЯЕТ ОПРЕДЕЛИТЬ:

- а) количество делящихся клеток
- б) количество покоящихся клеток
- в) идентифицировать вирусную ДНК.

14. ТЕХНИКА ГИБРИДИЗАЦИИ ПРИМЕНЯЕТСЯ ДЛЯ

- а) идентификации вирусной ДНК
- б) идентификации Т-клеточных лимфом
- в) диагностики некоторых анемий
- г) изучения генома при его врожденных нарушениях

15. ЦЕЛЮ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОГО ВСКРЫТИЯ ЯВЛЯЕТСЯ ВЫЯСНЕНИЕ

- а) внешних причин смерти
- б) диагноза заболевания
- в) давности наступления смерти
- г) причины смерти

16. ОБЪЕКТАМИ ПРИЖИЗНЕННОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯВЛЯЮТСЯ

- а) послед
- б) операционный материал
- в) биологические жидкости
- г) экспериментальный материал
- д) биопсийный материал

17. ЗАБОР БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА ПРОВОДИТСЯ С ЦЕЛЮ

- а) удаление патологического очага
- б) оценка эффективности проведенного лечения

в) морфологическая диагностика

18. ИССЛЕДОВАНИЕ ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА НЕОБХОДИМО ДЛЯ

- а) определение показаний к предстоящей операции
- б) контроль качества и объема проведенной операции
- в) уточнение клинического диагноза

19. К СПОСОБАМ БИОПСИИ ОТНОСЯТСЯ

- а) тракционная
- б) инцизионная
- в) пункционная
- г) аспирационная

20. БИОПТАТ ПОЛУЧАЮТ ПРИ

- а) взятии мазка-отпечатка
- б) эндоскопическом исследовании
- в) лучевой диагностике
- г) операции

21. ПРИ ПОДГОТОВКА ОПЕРАЦИОННОГО (БИОПСИЙНОГО) МАТЕРИАЛА К МОРФОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ПРОВОДЯТ

- а) фрагментацию
- б) маркировку
- в) промывание
- г) фиксацию

22. К ВИДАМ ЗАКЛЮЧЕНИЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОТНОСЯТ

- а) описательным
- б) предположительным (ориентировочным)
- в) макроскопическим
- д) окончательным

23. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЙ ПРИ ПРИЖИЗНЕННОЙ МОРФОЛОГИЧЕНКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВКЛЮЧАЕТ

- а) выдачу заключений и архивирование

- б) забор материала на бактериологическое исследование
- в) гистологическую обработку объектов
- г) морфологическую диагностику
- д) прием и регистрацию материала
- е) макроскопическое описание и вырезку

24. ОПИСАТЕЛЬНЫЙ ХАРАКТЕР ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДАЕТСЯ

- а) при низкой информативности забранного материала
- б) при недостатке клинических данных
- в) в случае дефектов гистологической обработки препарата

25. УВЕЛИЧЕНИЕ СРОКА ПО МАТЕРИАЛАМ ПРИЖИЗНЕННОЙ
МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРОИСХОДИТ

- а) при исследовании кальцинатов и костной ткани
- б) при применении дополнительных методов диагностики
- в) при исследовании крупных объектов

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Решение данных ситуационных задач направлено на формирование общепрофессиональных и профессиональных компетенций ОПК-9, ПК-5, ПК-6.

Задача № 1.

Больная А, 32 лет, госпитализирована в гинекологическое отделение с жалобами на нарушение менструального цикла по типу метроррагии, периодически возникающие боли внизу живота, скудные бели, повышение температуры тела по вечерам до субфебрильных цифр. На 15 день менструального цикла выполнено лечебно-диагностическое выскабливание полости матки. Материал направлен для гистологического исследования в патологоанатомическое отделение на следующий день. Клинический диагноз: Хронический эндометриоз в стадии обострения. Заключение патологоанатома: Эндометриоз соответствует ранней стадии фазы секреции менструального цикла. Хронический неспецифический эндометрит в фазе обострения.

Ответить на следующие вопросы:

1. К какому виду материала относится соскоб из полости матки, полученный во время лечебно-диагностического выскабливания и направленный на гистологическое исследование?
2. Какой метод фиксации материала чаще используется в таких случаях?
3. Какой характер имеет данное патологоанатомическое заключение?
4. Какие сроки исследования материала в данном случае являются нормативными, и как называется такое исследование в зависимости от сроков ответа?

Задача № 2.

У больной 48 лет клинически диагностирована опухоль правой молочной железы. Выполнена биопсия опухоли, после морфологического исследования диагностирована низкодифференцированная карцинома молочной железы. Патоморфологом назначено проведение углубленного морфологического исследования в результате которого установлен железистый характер новообразования, а также определено наличие и концентрация рецепторных белков к эстрогенам (ER) и прогестеронам (PgR), определены маркер пролиферативной активности (Ki67) и прогностический маркер (Her2/neu) в опухолевых клетках.

Ответить на следующие вопросы:

1. Какое исследование позволило установить злокачественный характер опухоли?
2. Какой метод молекулярного исследования был проведен?
3. Какой диагностической ценностью этот метод обладает в данном случае?
4. Какой молекулярный метод исследования позволил бы определить способность опухоли к продукции мукополисахаридов?
5. Какой метод исследования позволит определить уровень амплификации онкогена, кодирующего белок Her2/neu в опухолевых клетках?

Задача № 3.

У больного 62 лет клинически определено увеличение шейного лимфоузла. При осмотре узел плотной консистенции, бугристый, спаянный с подлежащими тканями. Проведена биопсия данного образования с направительным клиническим диагнозом: хронический неспецифический лимфаденит, опухоль? В ходе морфологического исследования биоптата выявлены разрозненные группы атипичных клеток, не формирующих упорядоченных структур. При проведении иммуногистохимического исследования с «первой панелью» антител, выявлена позитивная реакция

опухолевых клеток на антитела к цитокератину, негативная – к виментину, общему лейкоцитарному антигену и белку S-100.

Ответить на следующие вопросы:

1. Какое исследование позволило установить злокачественный характер опухоли и почему?
2. Какое происхождение опухолевых клеток наиболее вероятно, учитывая их антигенный профиль?
3. Какой характер опухолевого поражения лимфоузла наиболее вероятен в данном случае и почему?
4. Какие последующие иммуногистохимические исследования будут наиболее информативными?
5. Какой диагностической ценностью будет обладать иммуногистохимический метод в данном случае?

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ И СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

Тестовые задания

№	Ответ	№	Ответ	№	Ответ	№	Ответ	№	Ответ
1	б	6	а	11	а, б	16	а, б, д	21	б, г
2	б	7	в	12	а, в, г	17	б, в	22	а, б, д
3	в	8	а	13	а, б	18	б, в	23	д, е, в, г, а
4	в	9	а	14	а, г	19	б, в, г	24	а, б
5	а	10	а, б, г	15	б, г	20	б, г	25	а, б

Ситуационные задачи

Задача №1.

1. Материал называется биопсийным (биопсия) – морфологическое исследование прижизненно иссеченных или изъятых другим способом

тканей и частей органов для целей диагностики и /или оценки эффективности примененного лечения. В зависимости от способа получения диагностического материала это кюретаж-биопсия, полученная в результате соскоба.

2. Для предотвращения аутолиза тканей объекты для прижизненной морфологической диагностики должны быть подвергнуты фиксации, для этих целей чаще всего используют 10% раствор нейтрального формалина.

3. Данное патологоанатомическое заключение имеет окончательный характер, так как позволяет верифицировать у пациентки конкретный патологический процесс с выделением его клинкоморфологического варианта и особенностей течения.

4. Заключение патологоанатома по результатам исследования дается через 4 рабочих дня после поступления материала. Такое заключение называется плановым, в отличие от срочного (ответ дается через 20-25 мин).

Задача №2.

1. Гистологическое исследование (светооптическая микроскопия), поскольку именно оно позволило выявить признаки клеточного и тканевого атипизма – важных свойств злокачественной опухоли.

2. Иммуногистохимический – способ определения молекул белков-рецепторов в клетках тканей на основе иммунологической реакции между искомым антигеном и антителом к нему с последующей визуализацией иммунного комплекса.

3. Возможности иммуногистохимического исследования по выявлению цито и тканеспецифических антигенов позволяют установить гистогенез опухоли.

4. Способность мукополисахаридов давать красочную реакцию с реактивом Шиффа и альциановым синим в гистологических срезах позволяет использовать гистохимическое исследование для их выявления и локализации.

5. Флуоресцентная или хромогенная гибридизация *in situ* (FISH, CISH) основанная на прямом выявлении нуклеиновых кислот в клетках методом ПЦР с сохранением их морфологии.

Задача №3.

1. Гистологическое исследование (светооптическая микроскопия), поскольку именно оно позволило выявить признаки клеточного и тканевого атипизма – важных свойств злокачественной опухоли.

2. Эпителиальное происхождение, учитывая, что цитokerатины являются специфическими маркерами эпителиальных клеток, а антигены других типов тканей (мезенхимального и нейроэктодермального происхождения) в опухолевых клетках не обнаружены.

3. Наиболее вероятен метастатический характер поражения лимфоузла, поскольку первичные опухоли эпителиального происхождения в лимфоузлах не развиваются.

4. Реакции с типоспецифическими и тканеспецифическими антителами к цитокератинам для определения гистогенетической и органной принадлежности опухолевых клеток.

5. Комплексное иммуногистохимическое исследования с использованием широкого спектра антицитокератиновых антител позволит определить гистогенез опухоли и ее возможную первичную органную локализацию.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная:

1. Кисслич Р. Атлас эндомикроскопии. Кисслич Р., Гэйл П., Ньюрат М.; [пер. с англ.]; под ред. Ф. Г. Забозлаева, В. В. Соколова. С. С. Пирогова. – М.: Издат. дом «Практическая медицина», 2018. – 144 с.
2. Мальков П. Г. Стандартные технологические процедуры при проведении патологоанатомических исследований; клинические рекомендации. П. Г. Мальков, Г. А. Франк, М. А. Пальцев. – М.: Издат. дом «Практическая медицина», 2017. – 136 с.
3. Патологоанатомические исследования: нормативные документы / под ред. Г. А. Франка, П. Г. Малькова. – М.: Издат. дом «Практическая медицина», 2017. – 216 с.
4. Мальков П. Г. Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике: руководство / под ред. П. Г. Малькова, Г. А. Франка. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 176 с.
5. Малотравматичные технологии в патологоанатомической практике / Т. И. Мустафин и др.; под ред. Т.И. Мустафина. – М.: Медицинская книга, 2014. – 112с.
6. Морфологическая диагностика: учеб.пособие / Д. Э. Коржевский. – С-Пб.: Изд-во СпецЛит. – 2013. – 128 с.
7. Кумар В. Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Котрану. В 3 т. [пер. с англ.] / Кумар В., Аббас А.К., Фаусто Н., Астер Дж. К.; под ред. Е.А. Коган. – Изд-во Логосфера. – 2014. – 624 с.
8. Павлова Т.В. Клиническая и экспериментальная морфология / Т.В. Павлова, В.Ф. Куликовский, Л.Л. Павлова. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2016. – 256 с.
9. Патологическая анатомия. Национальное руководство. / под ред. М.А. Пальцева, Л.В. Кактурского, О.В. Зайратьянц. – Изд-во ГЭОТАР-Медиа. – 2014. – 1264 с.
10. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. / под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. – 4-е изд., перераб. и доп. – Казань, 2013. – 624 с.
11. Струков А. И. Патологическая анатомия: учебник [Электронный ресурс] / А. И. Струков, В. В. Серов; под ред. В. С. Пауков. – 6-е изд., перераб. и доп. – Электрон. текстовые дан. – М.: Гэотар Медиа, 2015.– 880 с. – Режим доступа:
<http://www.studmedlib.ru/ru/book/ISBN9785970432600.html>
12. Патологическая анатомия: атлас [Электронный ресурс] / под ред. О.В. Зайратьянца. – Электрон. текстовые дан. – М.: Гэотар Медиа, 2014. – on-line. – Режим доступа:
<http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970427804.html>

Дополнительная:

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 245 с.
2. Автандилов Г.Г. Основы патологоанатомической практики. – М.: РМАПО, 1998. – 234 с.
3. Басинский В.А. Краткий курс клинической лабораторной цитологии. / В.А. Басинский и др. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – 292 с.
4. Введение в молекулярную медицину / под ред. М. А. Пальцева. – М.: Изд-во «Медицина», 2004. – 496 с.
5. Колтовой Н.А. Краевой С.А. Флуоресцентные методы диагностики в медицине. Монография. — М.: Bookvika.ru. 2014. — 228 с.
6. Микроскопическая техника: руководство/ под ред. Д. С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
7. Пальцев М.А. Руководство по биопсийно-секционному курсу: учеб. пособие. / М.А. Пальцев, В.Л. Коваленко, Н.М. Аничков. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2004. – 256 с.
8. Рыков В.А. Справочник патологоанатома/ Серия «Медицина для вас».– Ростов-на-Дону: «Феникс», 2004. – 256 с.
9. Спиридонов В.А. К вопросу развития виртуальной аутопсии в России, или что делать. / В.А. Спиридонов // Судебная медицина. / – Т2. – №2.– 2016. – С.93-94.
10. Erozan Y.S., Tatsas A. Cytopathology of Liver, Biliary Tract, Kidney and Adrenal Gland. Springer, 2015. – 202 p.
11. Field Andrew S. (ed.) Practical Cytopathology. A Diagnostic Approach to Fine Needle Aspiration Biopsy. Elsevier, 2017. – 563 p.
12. Gill Gary. Cytopreparation: Principles & Practice. Springer, 2013. – 449 p.
13. Khalbuss W.E., Means M. Gynecological and Breast Cytopathology Board Review and Self-Assessment. Springer, 2013. – 576 p.
14. Kocjan Gabrijela. Cytopathology of the Head and Neck: Ultrasound Guided FNAC. 2nd ed. –Wiley-Blackwell, 2017. – 212 p.
15. Sheaff Michael T., Singh N. Cytopathology: An Introduction. Springer, 2013. – 486 p.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Приложение № 2
к приказу Министерства здравоохранения
Российской Федерации
от «24» марта 2016 г. № 1794

Наименование медицинской организации _____

Код формы по ОКУД _____

Код учреждения по ОКПО _____

Адрес _____

Медицинская документация

Учетная форма № 014/у

Утверждена приказом Минздрава России

от « » _____ 2016 г. № _____

НАПРАВЛЕНИЕ НА ПРИЖИЗНЕННОЕ ПАТОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПСИЙНОГО (ОПЕРАЦИОННОГО) МАТЕРИАЛА

1. Отделение, направившее биопсийный (операционный) материал _____
2. Фамилия, имя, отчество (при наличии) пациента _____

3. Пол: муж. – 1, жен. – 2, 4. Дата рождения: число _____ месяц _____ год _____

5. Полис ОМС _____ 6. СНИЛС _____

7. Место регистрации: _____ тел. _____

8. Местность: городская – 1, сельская – 2.

9. Диагноз основного заболевания (состояния) _____

10. Код по МКБ* _____

11. Задача прижизненного патолого-анатомического исследования биопсийного (операционного) материала _____

12. Дополнительные клинические сведения (основные симптомы, оперативное или гормональное, или лучевое лечение, результаты инструментальных и лабораторных исследований) _____

13. Результаты предыдущих прижизненных патолого-анатомических исследований (наименование медицинской организации, дата, регистрационный номер, заключение) _____

14. Проведенное предоперационное лечение (вид лечения, его сроки, дозировка лекарственного препарата, доза облучения) _____

15. Способ получения биопсийного (операционного) материала: эндоскопическая биопсия – 1, пункционная биопсия – 2, аспирационная биопсия – 3, инцизионная биопсия – 4, операционная биопсия – 5, операционный материал – 6, самопроизвольно отделившиеся фрагменты тканей – 7.

16. Дата забора материала _____ время _____

17. Материал помещен в 10%-ный раствор нейтрального формалина (да/нет) _____

18. Маркировка биопсийного (операционного) материала (расшифровка маркировки флаконов):

Номер флакона	Локализация патологического процесса (орган, топография)	Характер патологического процесса (эрозия, язва, полип, пятно, узел, внешне неизменная ткань, отношение к окружающим тканям)	Количество объектов
1			
2			
3			
4			
5			

19. Фамилия, инициалы врача _____ подпись _____

20. Дата направления: « » _____ 20 г., телефон _____

* Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем.

Наименование медицинской
организации

Код формы по ОКУД _____
Код учреждения по ОКПО _____

Адрес

Медицинская документация
Учетная форма № 014-1/у
Утверждена приказом Минздрава России
от "___" _____ 2016 г. № _____

**Протокол прижизненного патолого-анатомического исследования
биопсийного (операционного) материала**

1. Отделение, направившее биопсийный (операционный) материал _____
2. Фамилия, имя, отчество (при наличии) пациента _____
3. Пол: муж. — 1, жен. — 2. 4. Дата рождения: число ___ месяц ___ год ___
5. Полис ОМС _____ 6. СНИЛС _____
7. Место регистрации _____
тел. _____
8. Местность: городская — 1, сельская — 2.
9. Диагноз заболевания (состояния) по данным направления _ 10. Код по МКБ¹ _
11. Дата забора материала по данным направления _____ время _____
12. Материал доставлен в 10%-ный раствор нейтрального формалина
(да/нет) _____ загрязнен (да/нет) _____
13. Дата поступления биопсийного (операционного) материала: дата _____
время _____
14. Отметка о сохранности упаковки _____
15. Дата регистрации биопсийного (операционного) материала: дата _____
время _____
16. Регистрационный номер _____
17. Медицинские услуги: код __, количество _ 18. Категория сложности (1–5) _
код __, количество _
код __, количество _
19. Вырезка проводилась: дата __ время __ 20. В проводку взято __ объектов
21. Назначенные окраски (реакции, определения):

22. Макроскопическое описание:

23. Микроскопическое описание:

форма № 014-1/у

24. Заключение:

25. Код по МКБ _____

26. Комментарии к заключению и рекомендации:

27. Прижизненное патолого-анатомическое исследование выполнили:

Врач-патологоанатом _____ М.П. _____
(фамилия, инициалы) (подпись)

Врач-специалист,
осуществляющий консультирование _____ М.П. _____
(фамилия, инициалы) (подпись)

28. Дата проведения прижизненного патолого-анатомического исследова-
ния: "___" _____ 20__ г.

¹Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем (далее — МКБ).

Приложение 2

Приложение № 2
к приказу Министерства здравоохранения
Российской Федерации
от «6» июня 2013 г. № 354н

_____ (полное наименование медицинской организации)

Код формы по ОКУД _____
Код учреждения по ОКПО _____

Медицинская документация
Учетная форма № 013/у

_____ (адрес медицинской организации)

Утверждена приказом Минздрава России
от 6 июня 2013 г. № 354н

ПРОТОКОЛ патолого-анатомического вскрытия № _____

« ____ » _____ 20 ____ г.

1. Наименование медицинской организации и отделения, в котором наблюдался и умер пациент(ка) _____
2. Медицинская карта амбулаторного (стационарного) пациента № _____
3. Фамилия, имя, отчество умершего (ей) _____
4. Пол: мужской 1, женский 2 _____
5. Дата рождения: число _____ месяц _____ год _____
6. Дата смерти: число _____ месяц _____ год _____, время _____
7. Место жительства (регистрации) умершего (ей): республика, край, область _____
район _____ город _____ населенный пункт _____
улица _____ дом _____ квартира _____
8. Местность: городская – 1, сельская – 2 _____
9. Семейное положение: состоял (а) в зарегистрированном браке – 1, не состоял (а) в зарегистрированном браке – 2, неизвестно – 3 _____
10. Образование: профессиональное; высшее – 1, неполное высшее – 2, среднее – 3, начальное – 4; общее: среднее (полное) – 5, основное – 6, начальное – 7; не имеет начального образования – 8, неизвестно – 9 _____
11. Занятость: руководители и специалисты высшего уровня квалификации – 1, прочие специальности – 2, квалифицированные рабочие – 3, неквалифицированные рабочие – 4, занятые на военной службе – 5, пенсионеры – 6, студенты и учащиеся – 7, работавшие в личном подсобном хозяйстве – 8, безработные – 9, прочие – 10 _____
12. Дата поступления в медицинскую организацию, в которой наблюдался и умер пациент (ка): число _____ месяц _____ год _____, время _____
13. Доставлен в медицинскую организацию, в которой наблюдался и умер пациент (ка) через _____ часов, _____ дней после начала заболевания _____
14. Фамилия, имя, отчество лечащего врача (фельдшера) _____
15. Лечащий врач (заведующий отделением) присутствовал на патолого-анатомическом вскрытии (да – 1, нет – 2): _____
16. Дата проведения патолого-анатомического вскрытия: число _____, месяц _____, год _____

**КОРЕШОК МЕДИЦИНСКОГО СВИДЕТЕЛЬСТВА О СМЕРТИ
К УЧЕТНОЙ ФОРМЕ № 106/У-08**

СЕРИЯ _____ № _____

Дата выдачи « _____ » _____ 20 ____ г.

**(окончательного, предварительного, взамен предварительного, взамен окончательного)
(подчеркнуть)**

серия _____ № _____ « _____ » _____ 20 ____ г.

1. Фамилия, имя, отчество умершего(ей) _____
 2. Пол: мужской [1], женский [2]
 3. Дата рождения: число _____, месяц _____, год _____
 4. Дата смерти: число _____, месяц _____, год _____, время _____
 5. Место постоянного жительства (регистрации) умершего(ей): республика, край, область _____
район _____ город _____ населенный пункт _____
улица _____ дом _____ кв. _____
 6. Смерть наступила: на месте происшествия [1], в машине скорой помощи [2], в стационаре [3], дома [4], в другом месте [5]
- Для детей, умерших в возрасте до 1 года:**
7. Дата рождения: число _____, месяц _____, год _____, число месяцев _____, дней жизни _____
 8. Место рождения _____
 9. Фамилия, имя, отчество матери _____

линия отреза

Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации Наименование медицинской организации _____ адрес _____ Код по ОКПО _____ Для врача, занимающегося частной практикой: номер лицензии на медицинскую деятельность _____ адрес _____

Код формы по ОКУД _____ Медицинская документация Учетная форма № 106/у-08 Утверждена приказом Минздравсоцразвития России от «26» декабря 2008 г. №782н
--

МЕДИЦИНСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО О СМЕРТИ

СЕРИЯ _____ № _____

Дата выдачи « _____ » _____ г.

(окончательное, предварительное, взамен предварительного, взамен окончательного (подчеркнуть))

серия _____ № _____ « _____ » _____ 20 ____ г.

1. Фамилия, имя, отчество умершего(ей) _____
2. Пол: мужской [1], женский [2]
3. Дата рождения: число _____, месяц _____, год _____
4. Дата смерти: число _____, месяц _____, год _____, время _____
5. Место постоянного жительства (регистрации) умершего(ей): республика, край, область _____
район _____ город _____ населенный пункт _____
улица _____ дом _____ кв. _____
6. Местность: городская [1], сельская [2]
7. Место смерти: республика, край, область _____
район _____ город _____ населенный пункт _____
улица _____ дом _____ кв. _____
8. Местность: городская [1], сельская [2]
9. Смерть наступила: на месте происшествия [1], в машине скорой помощи [2], в стационаре [3], дома [4], в другом месте [5]
10. Для детей, умерших в возрасте от 168 час. до 1 месяца: доношенный (37-41 неделя) [1], недоношенный (менее 37 недель) [2], переносивший (42 недели и более) [3]
11. Для детей, умерших в возрасте от 168 час. до 1 года:
масса тела ребенка при рождении _____ грамм [1], каким по счету был ребенок у матери (считая умерших и не считая мертворожденных) _____ [2], дата рождения матери _____ [3], возраст матери (полных лет) _____ [4],
фамилия матери _____ [5], имя _____ [6], отчество _____ [7]
- 12.* Семейное положение: состоял(а) в зарегистрированном браке [1], не состоял(а) в зарегистрированном браке [2], неизвестно [3]
- 13.* Образование: профессиональное: высшее [1], неполное высшее [2], среднее [3], начальное [4]; общее: среднее (полное) [5], основное [6], начальное [7]; не имеет начального образования [8]; неизвестно [9]
- 14.* Занятость: был(а) занят(а) в экономике: руководители и специалисты высшего уровня квалификации [1], прочие специалисты [2], квалифицированные рабочие [3], неквалифицированные рабочие [4], занятые на военной службе [5]; не был(а) занят(а) в экономике: пенсионеры [6], студенты и учащиеся [7], работавшие в личном подсобном хозяйстве [8], безработные [9], прочие [10]
15. Смерть произошла: от заболевания [1]; несчастно, случая: не связанного с производством [2], связанного с производством [3]; убийства [4]; самоубийства [5]; в ходе действий: военных [6], террористических [7]; род смерти не установлен [8]

* В случае смерти детей, возраст которых указан в пунктах 10-11, пункты 12 - 14 заполняются в отношении их матерей.

Оборотная сторона

Мустафин Тагир Исламнурович
Двинских Алексей Викторович
Куклин Дмитрий Сергеевич
Шарифгалиев Ильдар Асхадуллович

**Современные методы
морфологической диагностики**

Учебно-методическое пособие

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.
Подписано к печати 08.02.2018 г.
Отпечатано на цифровом оборудовании
с готового оригинал-макета,
представленного авторами.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 6,98.
Тираж 260 экз. Заказ № 33.

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
Тел.: (347) 272-86-31, e-mail: izdat@bashgmu.ru
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России