

MATERIAL FIXATION IN HISTOCHEMISTRY

Priymak E.V. (Russian Federation) Email: Priymak59@scientifictext.ru

Priymak Elena Vitalievna – Student,
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF NATURAL SCIENCES,
TULA STATE LEV TOLSTOY PEDAGOGICAL UNIVERSITY, TULA

Abstract: *the article analyzes the various types of fixatives used in histochemical, histological, and cytochemical analysis. The chemical components, mode of action, advantages and disadvantages of fixers are discussed. The classification of chemical fixators (simple liquids) by the mechanism of the place of action is considered. Discloses the best methods of fixation of the drug: physical and chemical. A number of modern requirements for fixing the material and the key factors of its effectiveness are given.*

Keywords: *fixation, histochemistry, drug, histology, chemical fixation.*

ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА В ГИСТОХИМИИ

Приймак Е.В. (Российская Федерация)

Приймак Елена Витальевна – студент,
кафедра химии, факультет естественных наук,
Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, г. Тула

Аннотация: *в статье анализируются различные типы фиксаторов, используемые в гистохимическом, гистологическом, а также цитохимическом анализе. Обсуждаются химические составляющие, способ действия, преимущества и недостатки фиксаторов. Рассматривается классификация химических фиксаторов (простые жидкости) по механизму места действия. Раскрываются оптимальные методы фиксации препарата: физические и химические. Приводится ряд современных требований при фиксации материала и ключевые факторы ее результативности.*

Ключевые слова: *фиксация, гистохимия, препарат, гистология, химическая фиксация.*

Гистохимический препарат является основным объектом изучения химиков, биологов и врачей. В настоящее время, к нему устанавливается ряд требований: препарат должен быть тонким (5 — 10 мкм), прозрачным, легко пропускать пучок света и может представлять собой тонкий срез органа, тотальный препарат (напр., мягкая мозговая оболочка), отпечаток ткани (напр., отпечаток печени или селезенки), мазок (напр., спинномозговой жидкости или костного мозга), пленки (напр., брюшины). Классическим и основным объектом исследования в гистохимии является фиксированный и окрашенный срез клеток, ткани или органа.

Фиксация — это обработка материала, предназначенного для гистохимического анализа, т.е. перевод живого вещества из лабильного состояния в стабильное: прекращение процессов аутолиза и стабилизация веществ и структур клетки в такой мере, при которой их локализация, целостность и взаимное расположение практически не изменяются при последующем обезвоживании, заливке в парафин или в смолу, приготовления срезов, а также под воздействием пучка электронов, если проводится ультрацитохимический анализ [2, с. 527].

Правильный метод фиксации требует оптимизации препарата на основе применения и окрашивания целевого антигена. Это означает, что оптимальный метод фиксации может быть определен эмпирически. К наиболее распространенным методам фиксации относят:

1. Химическая фиксация:

— Перфузия: прижизненная быстрая фиксации тканей, органов или целого организма пропусканием (перфузией) фиксатора через кровеносные сосуды.

— Погружение: помещение образца в фиксатор, который затем диффундирует через ткань или клетки образца. Погружение часто сочетается с перфузией для обеспечения тщательной фиксации всей ткани.

2. Физическая фиксация:

— Замораживание: образцы с антигенами, которые являются слишком лабильными для химической фиксации или воздействия органических растворителей, могут быть встроены в криопротекторную среду для заливки, а затем мгновенно заморожены и долгое время храниться в жидком азоте [5, с. 343].

— Высушивание: мазки крови для окрашивания ИСС высушивают на воздухе и медленно проводят через пламя горелки с целью зафиксировать клетки на предметном стекле.

Чаще всего как в гистологической, так и гистохимической практике применяют метод химической фиксации. На его результативность влияет ряд факторов: время, прошедшее после взятия материала, продолжительность фиксации, рН и изотоничность фиксирующей среды, температура и химические свойства выбранного фиксирующего реагента.

Центральное значение среди вышеперечисленных показателей имеет время, прошедшее от прижизненного взятия материала из организма до начала фиксации. Данный срок должен быть максимально сжат, желательнее до пару минут, однако морфологическая сохранность, достаточная для идентификации ткани, клеток и веществ с целью патоморфологической диагностики, может быть неплохо обеспечена при фиксации материала через 30 — 80 мин после процедуры. Для гистохимических исследований, в основном, устанавливается температура от 0 до 4 °С, что замедляет аутолитические процессы и снижает скорость возможной диффузии исследуемого вещества [4, с. 218]. Значение водородного показателя (рН) исследуемого фиксатора должна быть близкой к нейтральной среде, т.к. концентрация его ионов водорода должна соответствовать таковой в тканях. Чрезмерно продолжительная фиксация приводит к существенному уплотнению материала, что затрудняет обработку фиксатора. Поэтому для каждого конкретного вида исследования подбирают наиболее приемлемый фиксатор.

В химической фиксации, в первую очередь, используют простые жидкости, классифицированные по механизму место действия: альдегиды, соли ртути, алкоголя, окислительные агенты и пикраты.

Альдегиды включают формальдегид (формалин) и глутаральдегид. Формальдегид фиксирует ткань поперечными связями, образуя мостики в белках, особенно между остатками лизина. Это сшивание не наносит существенного вреда структуре белков, следовательно, антигенность не теряется. Стандартный раствор содержит 10% нейтральный забуференный формалин. Буфер предотвращает кислотность, которая способствует аутолизу и вызывает осаждение пигмента формалин-гем в тканях. Исходя из этого, формальдегид широко применяют для иммуногистохимических методов [1, с. 488].

Глутаральдегид вызывает деформацию структуры альфа-спирали в белках, поэтому он не используется для иммуногистохимического окрашивания. Однако соединение очень быстро фиксируется, способствуя лучшему окрашиванию общих цитоплазматических и ядерных деталей, что преимущественно для электронной микроскопии. Стандартный раствор — 2% буферный глутаральдегид.

Ключевым преимуществом формальдегида по сравнению с глутаровым альдегидом является его повышенная проникающая способность. Но его взаимодействие с белками протекает медленно и сам процесс обратим. Таким образом, длительное отмывание кусочков от формальдегидного фиксатора нежелательно.

Фиксация тканей и клеток с помощью солей ртути протекает по неизвестному механизму. Последние содержат ртуть, фиксаторы В-5 и Zenker's. Указанные фиксаторы проникают относительно плохо и вызывают твердость тканей. Однако благодаря их быстрой фиксации, они дают четко окрашенные ядерные детали. Их лучшее применение — фиксация кровеносных и ретикулоэндотелиальных тканей, но, так как они содержат ртуть, утилизировать их следует осторожно [6, с. 719].

Спирты, включая метиловый спирт (метанол) и этиловый спирт (этанол), являются денатурирующими белками и обычно не используются для тканей, вследствие того, что вызывают большую хрупкость и твердость клетки. Тем не менее, алкоголь используется для окрашивания цитологических мазков, потому что действуют быстро и дают четко просматриваемые ядерные детали в микроскоп.

Окислительные агенты включают перманганатные фиксаторы (перманганат калия), дихроматные фиксаторы (дихромат калия) и тетроксид осмия. Они сшивают белки, но вызывают обширную денатурацию.

Пикраты включают фиксаторы с пикриновой кислотой. Главным среди них является жидкость Боуэна с неизвестным механизмом действия. Данный классический фиксатор схож с ртутным препаратом, но в отличие от последнего, он не вызывает особой твердости клеток и тканей. Пикриновая кислота представляет опасность взрыва в сухом виде.

Полноценная фиксация материала обеспечивается при соблюдении ряда требований.

1. Материал после среза немедленно погружают в фиксатор.
2. Объем фиксатора обязан превышать объем фиксируемого материала в 10 — 15 раз: тканевая жидкость может значительно изменить концентрацию фиксатора.
3. Немедленно заменить фиксатор, если его цвет изменится после погружения в него кусочков ткани.
4. Повторное использование фиксаторов запрещено.
5. Установленное время фиксации для каждого фиксатора индивидуально. Долгосрочное нахождение материала в фиксаторах возможно лишь, например, в 10% нейтральном формалине и жидкости Боуэна [3, с. 139].

Для фиксации хорошо применять емкости с широким горлом, чтобы не возникло ряд проблем с извлечением фиксированного материала. Правильность фиксации большинства рыхлых тканей, например легочной, достигается их помещением на дно банки, а поверх них — прокладки из слоя марли или ваты.

Список литературы / References

1. *Гайер Г.* Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. 488 с.
2. *Гордон Н.* Эмбриогенез.: Всемирное Научное Издательство, 2016. 527 с.
3. *Кирнан Дж.* Гистологические и гистохимические методы: теория и практика. В.: Блоксхэм, 2008. 139-140 с.
4. *Кузнецов С.Л.* Гистология, цитология и эмбриология. М.: Медицина, 2012. 218 с.
5. *Луппа Х.* Основы гистохимии. М.: Мир, 1980. 343 с.
6. *Ромейс Б.* Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностранной литературы, 2009. 719 с.