

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ

«УТВЕРЖДАЮ»



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный № 009-0215

**МЕТОД ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИПОФУСЦИНА
В ПЕЧЕНИ**

Инструкция по применения

УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный
Ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: Лебедева Е.И., д.м.н., профессор Мяделец О.Д., к.в.н., доцент
Лях А.Л.

Витебск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) именуемая метод гистохимического выявления липофусцина в печени, разработана с целью стандартизации оценки липофусцина в материале гистологических препаратов, применение которой улучшает дифференциальную гистохимическую диагностику смешанных дистрофий печени.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-гастроэнтерологов. Области применения: гистология, патологическая анатомия, гепатология. Уровень внедрения: областные и городские патологоанатомические бюро, патологоанатомические отделения диагностических центров.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

При использовании гистохимического метода по морфологической дифференцировке липофусцина в ткани печени необходимы:

Оборудование

1. Автомат для гистологической обработки ткани;
2. Станция для заливки ткани парафином;
3. Ротационный микротом;
4. Одноразовые лезвия для микротома;
5. Водяная баня для расправления срезов;
6. Нагревательный столик;
7. Предметные и покровные стекла;
8. Весы лабораторные.
9. Микроскоп.

Вспомогательные устройства и материалы

1. Гистологические кассеты с отрывной крышкой для проводки и заливки образцов ткани;
2. Лабораторная посуда;
3. Шкаф вытяжной;
4. Маркер (стеклограф).

Реактивы

1. Формалин (10% -ный);
2. Орто-ксилол – ГОСТ 12.1.005-88;
3. Спирт этиловый ректификат – ГОСТ Р 51652-2000;
4. Готовая гистологическая среда для заливки (или парафин);
5. Хлорид железа (III) – ГОСТ 4147-74;
6. Калия гексацианоферрат (III) – ГОСТ 4206-75;
7. Дистиллированная вода;
8. Полистирол.

Квалификация используемых реактивов должна быть не ниже «ч.д.а.». Допускается использование других средств измерения, устройств и материалов, которые не уступают по своим характеристикам средствам измерения, устройствам и материалам, приведенным выше.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Необходимость гистохимической верификации по биоптатам печени клинически установленных диагнозов гепатита или цирроза печени, а также дифференциальная диагностика смешанных дистрофий печени, что имеет большое значение для последующего назначения медикаментозной терапии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМИНЕНИЮ

При взятии материала (биоптаты печени) следует руководствоваться общими противопоказаниями к пункционной биопсии печени.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА Правила отбора материала на гистохимические исследования с целью обнаружения липофусцина в ткани печени

На исследование направляется один из следующих объектов:

1. Прижизненные пункционные биопсии печени. Пациентам проводят чрезкожную биопсию печени под УЗ-контролем, оснащенных линейными и конвексными датчиками 3,5 – 5,0 Мгц. Трепанобиопсии выполняют методом «свободной руки». Получение столбика ткани длиной до 21 мм для гистологического исследования осуществляют с помощью игл и автоматических устройств.

2. Аутопсийный патологический материал печени. Размер и фиксацию изъятых фрагментов определяют в соответствии с приказом Министерства Здравоохранения Республики Беларусь № 111 от 17.06.1993.

3. Экспериментальный материал печени лабораторных животных. Использование животных в эксперименте производится с соблюдением норм и правил, регламентированных законодательством Республики Беларусь (приложение к приказу Министерства Здравоохранения Республики Беларусь № 31 от 31.10.2006) и международными рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов в научных и иных целях (г. Страсбург, 1986).

Подготовка оборудования

Включают автомат для гистологической обработки ткани и устанавливают параметры для работы. Станцию для заливки ткани парафином включают за час до работы. Для получения срезов монтируют с регулировкой одноразовое лезвие на ротационном микротоме. Предварительно включают водяную баню (температура 50⁰С) и нагревательный столик (температура 58⁰С).

Гистохимическое исследование

1. Образцы печени фиксируют в 10%-ном формалине (биоптаты в течение 2 ч, кусочки печени размером 0,5 см³ – в течение 48 часов).

2. После фиксации образцы помещают в гистологические кассеты. Затем кассеты с исследуемым материалом помещают в автомат для гистологической обработки ткани.

3. После автоматической проводки объекты заливают в гистологическую среду на станции для заливки ткани.

4. С помощью ротационного микротомы получают серийные срезы толщиной 4 мкм и наклеивают их на предметные стекла с использованием водяной бани для расправления срезов, в которой постоянная температура воды должна составлять 50⁰С. Затем предметные стекла помещают для высыхания на нагревательный столик с температурой 58⁰С; при этом заливочная среда хорошо расправляется. Дальнейшую обработку срезов проводят обязательно в вытяжном шкафу.

5. Проводят депарафинирование срезов. Гистологические срезы промывают в трех порциях ксилола, двух порциях 96⁰ и в одной порции 70⁰ спирта по 3 мин в каждой порции.

6. После депарафинирования срезы промывают в двух порциях дистиллированной воды в течение 6 минут.

7. После промывания срезы обрабатывают при комнатной температуре в течение 10 мин смесью равных частей 1%-ного раствора хлорида железа и 1%-ного раствора калия гексацианоферрата.

8. После обработки в красящем растворе срезы тщательно промывают в дистиллированной воде в течение 6 мин.

9. После погружения в дистиллированную воду срезы обезвоживают. Для этого их обрабатывают в течение 2 мин в 70⁰ спирте, затем 2 мин в 96⁰ спирте. Просветляют срезы в двух порциях ксилола по 2 мин в каждой и заключают в полистирол.

Липофусцин, содержащийся в печени, окрашивается в сине-зеленый, зелено-желтый или темно-синий цвет. Отложения липофусцина определяется в следующих вариантах: в виде гранул, конгломератов, может располагаться вокруг крупных капель жира, а также диффузно в соединительной ткани и в гепатоцитах, вокруг кровеносных сосудов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано. При проведении гистохимического исследования с целью обнаружения липофусцина в ткани печени ошибки могут быть обусловлены следующими причинами.

1. Неправильная фиксация материала, что может привести к артефициальным изменениям ткани печени, которые могут быть ошибочно расценены как патологические;

2. Использование реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся реактивов также недопустимо, поскольку не может гарантировать достоверных результатов;

3. Неправильное разведение реактивов, несоблюдение временного и температурного режима при выполнении методики.

В связи с вышеизложенным во избежание подобных ошибок при проведении гистохимического исследования необходимо строго следовать требованиям настоящей инструкции.