



# **Вступ до лабораторної діагностики Гістологічна лабораторія та дослідження Оформлення методик дослідження в дисертації**

**Лектор – д.мед.н, доц. Роман Москаленко**

# Сьогодні в програмі:

## *Частина 1:*

- Лабораторні дослідження: матеріали, правила, профілі
- Правила безпеки в лабораторії

## *Частина 2:*

- Гістологічна лабораторія
- Особливості підготовки гістологічних препаратів

## *Частина 3 (бонус):*

- Оформлення дослідницьких методів у розділі 2 дисертації  
«Матеріали і методи»/ FAQ

# Матеріали для досліджень

- Виділення людського організму (сеча, мокротиння, кал, виділення з статевих органів, слина)
- Біологічні рідини, отримані за допомогою проколу або пункції (кров, ліквор, випіт, кістковий мозок, вміст кіст, пухлин)
- Біологічні рідини, отримані шляхом зондування (дуоденальний вміст, шлунковий сік)
- Інші матеріали (волосся, вміст шкірних виразок і папул, нігті)

# Забір біологічного матеріалу

- Кров беруть шляхом венепункції в хімічно чистий посуд
- Легкий сніданок не впливає на більшість біохімічних показників крові
- Кров якнайшвидше розділяють на формені елементи та плазму
- Гемолізовану сироватку або плазму не рекомендовано використовувати для аналізу
- Сечу після забору заморожують або додають консерванти
- Біологічні матеріали вимагають правильного температурного режиму (низьких температур від 0°C до -80°C)

# Профілі лабораторних досліджень

Організовані переважно за органним принципом, включають в себе біохімічні, цитологічні та підрахункові показники з метою комплексної діагностики.

*Основні профілі:*

- Печінковий
- Нирковий
- Серцевий
- Ліпідний
- Щитоподібної залози
- Кістковий
- Контрольний (= традиційний біохімічний аналіз крові)

# Основи техніки безпеки з біологічним матеріалом

- Будь-який біологічний матеріал взятий від хворих або здорових людей є ПОТЕНЦІЙНО ЗАРАЗНИМ
- Використання одноразових інструментів
- Особи, які безпосередньо контактують з матеріалом повинні використовувати рукавички та захисний одяг
- Транспортування зразків з дотриманням заходів безпеки (спеціальні контейнери, температурний режим)
- Дезінфекція забруднених поверхонь, утилізація використаного брудного матеріалу в спеціальні сміттєві контейнери
- Особиста гігієна!

# Основи безпеки в лабораторіях



- Все - згідно мануалів, правил та прописів
- Досліди з отруйними, небезпечними та смердючими речовинами проводити лише під витяжкою
- Не виливати в раковини луги, кислоти та вибухонебезпечні речовини
- Заборонено пробувати на смак хімічні речовини
- При загоранні – тушити спецзасобами або піском, але не водою
- При опіках їдкими речовинами – промивати великою кількістю води, потім – згідно походження речовини: луг – гаситься 1% оцтовою кислотою, кислота – 2% розчином кухонної соди
- При порізах битим склом (ріжучими поверхнями матеріалів) – скалки видаляються пінцетом, рана обробляється антисептиком, пов'язка.

# Ступінь чистоти реактивів

- Технічні (техн) – низький ступінь
- Чисті (ч) більш високий ступінь чистоти, але не рекомендуються для проведення аналізів. Якщо на етикетці немає категорії ступеню чистоти – вважається, що це «ч»
- Чисті для аналізу (ч.д.а) – реактиви використовуються для більшості лаб робіт
- Хімічно чисті (х ч) – реактиви з найвищим ступенем чистоти, застосовуються для аналізів, титрів, буферів
- Фармакологічні препарати – вважаються за ступенем чистоти між «ч.д.а» та «х.ч», часто використовуються в експериментах
- Препарати особливих кваліфікацій – різні, наприклад «очищений» від домішки знаходиться між «ч» та «техн», але для хроматографії використовуються препарати вище «х.ч»



# Вода для досліджень

- Дистильована вода
- Бідистильована вода
- Демінералізована вода (Q-water)



# Методи досліджень на курсі БхіМД в Т&Х

- Гістологічні лабораторії та особливості методики
- Імуногістохімічний метод дослідження та практичне застосування
- Електрофорез білків, вестерн-блот, імунодот:  
лабораторне осанщення та методика

# Гістологічна лабораторія та підготовка біоматеріалу

## **Частина 2**

# Гістологічне дослідження - **ЗОЛОТИЙ СТАНДАРТ**

- ❖ Гістологія людини — розділ медицини, що вивчає будову тканин людини.
- ❖ Гістопатологія — це розділ мікроскопічного вивчення пошкодженої тканини, він є важливим інструментом патологічної анатомії, оскільки точний діагноз раку та інших захворювань зазвичай вимагає гістопатологічного дослідження зразків.



# Гістологічна лабораторія



❖ **Лабораторія** (середньовічна лат. *laboratorium*, від лат. *laboro* — працюю, лат. *labor* — праця, робота) — багатозначний термін, у даному випадку означає:

❖ Спеціально обладнане та устатковане приладами, пристроями, мережами приміщення для гістологічних досліджень, навчальних робіт, аналізів та експериментів спрямування біомедичного

# Типове оснащення гістолабораторії

- ❖ Витяжна шафа з проточною водою
- ❖ Пристрій для зневоднення
- ❖ Апарат для заливки
- ❖ Мікротом (санний чи ротаційний)
- ❖ Термостати
- ❖ Лабораторний посуд
- ❖ Ваги
- ❖ рН-метр
- ❖ 100 і 1 дрібниця



# Найскромніша лабораторія сьогодні це - 0,9 млн UAH

- ❖ Витяжна шафа з проточною водою ≈ 50 000
- ❖ Гістопроесор ≈ 250 000
- ❖ Апарат для заливки ≈ 180 000
- ❖ Мікротом ≈ 250 000
- ❖ Термостати (x2) ≈ 40 000
- ❖ Лабораторний посуд ≈ 20 000
- ❖ Ваги ≈ 20 000
- ❖ рН-метр ≈ 5 000
- ❖ Барвники ≈ 25 000
- ❖ Реактиви (спирти, ксилол, парафін) ≈ 20 000
- ❖ Розхідні матеріали (касети, марля і тд) ≈ 5 000

# БІОМАТЕРІАЛ

## Умови

- ❖ Ранній забір біоматеріалу
- ❖ Мінімальне втручання
- ❖ Фіксація!
- ❖ Маркування

## Проблеми

- ❖ Механічне ушкодження
- ❖ Висихання зразка
- ❖ Нагрівання
- ❖ Охолодження
- ❖ Хімічне ушкодження
- ❖ Людський чинник



# ЗРАЗОК ТКАНИНИ

## Фіксація

- ❖ Спочатку фіксатор у просторій посудині, потім зразок
- ❖ Орган/тканина - увесь
- ❖ Порожністі органи розрізаються, розпластують на пластинці
- ❖ Те, що спливає, прикривають марлею
- ❖ Співвідношення зразок : фіксатор 1:10-20 разів (1:5 мін)

## Вирізка

- ❖ Розмір 1,0x1,0 см
- ❖ Товщина 3-7 мм
- ❖ Найкращий – прямокутник/квадрат зі стороною 5-8 мм
- ❖ Зріз повинен проходити через усі шари тканини

# Зневоднення та ущільнення

- ❖ Треба ущільнювати тканину, бо тонко (3-5 мкм) не зріжемо
- ❖ Тільки парафін економічно обґрунтовано допомагає ущільнити
- ❖ Розчин формальдегіду водний, а парафін не змішується з водою ☹
- ❖ Воду – геть!
- ❖ Дегідратація за допомогою «батареї» спиртів (70%-80%-90%-96%-100%) та ксилолу
- ❖ Укладання («зашивання») матеріалу: від марлі до касети
- ❖ Промивання зразків проточною водою
- ❖ Карусельні апарати АТ4-АТ6+ полегшили життя лаборантів

# Виготовлення парафінових блоків

- ❖ Вручну: парафін + віск 57-60 °С заливається у форми (порцелянові тиглі, Г-подібні бруски та ін), де уже покладені зразки; теплим пінцетом швидко монтуємо тканину
- ❖ Заливочна станція – вирішує більшість проблем. У м. Суми немає ні одної. Нагрів і охолодження парафіну, дозування.

# Виготовлення зрізів

- ❖ Краще один раз зробити, ніж розповідати. Процес має багато секретів, технічних особливостей, лайфхаків; кожен лаборант/«різчик»/оператор мікротома має набір своїх know how.
- ❖ Це і є реміснича цехова майстерність в конкретному цеху
- ❖ Мікротом! Тільки ротаційний, санний - в минулому або для маніаків
- ❖ Предметні скельця – краще не економити на них; для гістологів-безлабків є віконне скло, склоріз, мило, сода, хромова суміш, рідина Нікіфорова та яєчний білок. По сумі – економія сумнівна (якщо інгредієнти не крадені).

# Оформлення дослідницьких методів у дисертації

- Структура розділу «Матеріали і методи» в дисертаційній роботі
- Коротко про дизайн дослідження
- Приклади оформлення методів:
  - Гістологія та гістохімія
  - Імуногістохімія
  - Вестрен-блот
  - Імунодот

# Структура розділу «Матеріали і методи»

- ❑ Місце виконання роботи
- ❑ Загальний опис зразків/матеріалу
- ❑ Протокол комісії етики
- ❑ Деталізація зразків/матеріалу за видовим, гендерним, віковим складом та наявністю/відсутністю ознак, за якими було сформовано групи
- ❑ Перелік методів дослідження з описом:
  - від головних до другорядних;
  - інший варіант (морфологічний): від макро до мікро і нанорозмірів
  - або групування методик за спорідненістю (біохімічні, молекулярно-біологічні, морфологічні, фізико-хімічні...)
- ❑ Статистичний аналіз

# Приклад візуалізації дизайну



Аорта  
60



Аортальний  
клапан  
30



Щитоподібна  
залоза  
44



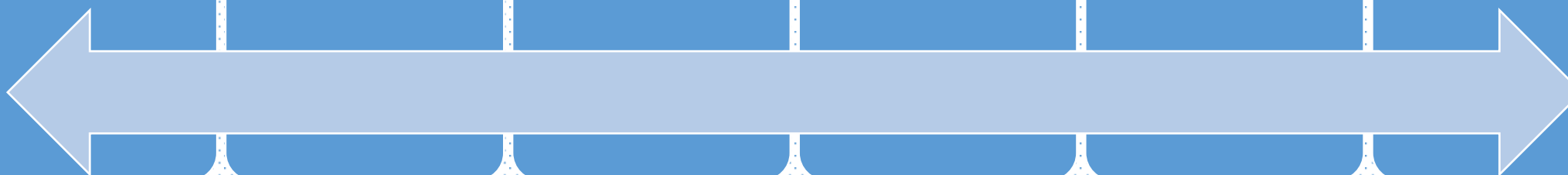
Простата  
20



Жовчний  
міхур  
20



Різні  
локалізації  
26



# Приклад дизайну в таблиці

	Матеріал	Мінералізована тканина/конкременти	Контроль	Всього
I підрозділ	Аорта	60	10	70
II підрозділ	Аортальні клапани	30	10	40
III підрозділ	Щитоподібна залоза	44	30	74
IV підрозділ	Простата	20	20	40
V підрозділ	Жовчний міхур	20	-	20
VI підрозділ	Слинна залоза	10	-	10
	Молочна залоза	10	-	10
	Підшлункова залоза	5	-	5
	Око	1	-	1
Разом		200	70	270



# Гістологічний та гістохімічний методи дослідження

Для гістологічного дослідження біологічний матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального буферного формаліну впродовж 24 годин. У подальшому матеріал зневоднювався і заливався парафіном в апараті карусельного типу «АТМ-4М» (Україна). На ротаційному мікротомі Shandon Finnesse 325 (Thermo Scientific) виконували парафінові серійні зрізи товщиною 4–5 мкм ( $4-5 \times 10^{-6}$  м). Депарафінізовані зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином, алізариновим червоним S (модифікація Даля-МакГі) та проводили PAS-реакцію.

# Імуногістохімічне дослідження біологічної тканини

З гістологічних парафінових блоків виготовляли серійні зрізи товщиною 4–5 мкм, які наносили на адгезивні скельця SuperFrost (Thermo Scientific) і висушували при температурі 37°C упродовж 18 годин. Депарафінізовані зрізи підлягали демаскуванню антигенів термічним методом шляхом нагрівання зрізів у цитратному буфері (рН 6,0) при температурі 95–98°C. Для візуалізації результатів ІГХ використовували систему детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer» (Thermo Scientific), яка включала в себе блокування ендогенної пероксидазної активності 3% перекисом водню, блокування неспецифічного фонового фарбування з використанням «Ultra V Block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto». У якості хромогену використовувався діамінобензидин (DAB) та аміноетилкарбазол (AEC). У дослідженнях використана наступна панель антитіл («Thermo scientific», США): S100A9, S100A8, OPN, CD 68, Caspase 3, MPO, Collagen 1. Для контролю якості проведеного ІГХ дослідження проводили активний та пасивний контроль отриманих результатів.

# Вестерн-блот аналіз

Перенесення протеїнів з ПААГ на нітроцелюлозу здійснювали за допомогою електроблотера. Нітроцелюлозну мембрану попередньо було витримано в буферному розчині для перенесення (25 мМ Tris-HCl, 0,1% ДСН, 20% метилового спирту, 192 мМ гліцину) протягом кількох хвилин. Після перенесення мембрану витримували в 1%-му розчині знежиреного молока в ЗФР упродовж 1 год при 37 °С. Після промивання нітроцелюлозну мембрану витримували за тих самих умов у розчині моноклональних антитіл проти гістидинового тегу, кон'югованих з пероксидазою хрому (в розведенні 1:10 000), в ТФБ. Проявлення нітроцелюлозної мембрани здійснювали протягом кількох хвилин у розчині для забарвлення, що містив 0,07% діамінобензидинтетрагідрохлориду (ДАБ) та 0,035% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ЗФР.

# Складні методи – результат з потом і кров'ю

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result



Cry



Sketching Science

# Імуно-дот

ПВДФ-мембрану занурювали у метанол на 1 хв, потім промивали у дистильованій воді впродовж 5 хв, потім промивали у PBST упродовж 5 хв. За допомогою хімічного олівця маркували на мембрані місця нанесення зразків та шкалу контролю (розчин білка, який визначається, у наростаючій концентрації). На ПДВФ-мембрану наносили розчин контрольного білка та зразків по 3 мкл, підсушували мембрану. Потім блокували 5% розчином бичачої сироватки упродовж 1 год. Після двократного промивання в PBST упродовж 5 хв, на досліджувані зразки наносили первинні антитіла (S100A9, 1:2000) на 1 год. Після цього етапу проводили чотирикратне промивання в PBST упродовж 5 хв. Далі переміщували ПДВФ мембрану у темряву і наносили вторинні антитіла (1:50000) на 1 годину. Потім проводили чотирикратне промивання в PBS упродовж 5 хв. Перенесення результатів з ПДВФ-мембрани на плівку здійснювали у темній кімнаті.

**Дякую за увагу всім слухачам!**

