

Николаева Л. П.

Приготовление гистологического препарата из костного мозга трубчатых костей

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого», Красноярск

Nikolaeva L.P.

Preparation of a histological specimen from bone marrow

Резюме

Изучение костного мозга является важной частью в прогнозировании терапевтического эффекта лечения клеточными продуктами. При морфологических исследованиях одним из основных методов получения информации является гистологический метод как наиболее известный и точный. Прижизненное получение костного мозга является достаточно сложным и трудоемким процессом. Мы столкнулись с необходимостью приготовления гистологических препаратов из костного мозга трубчатых костей и вследствие этого поставили цель: оптимизировать способ получения гистологических срезов костного мозга трубчатых костей.

Материалы и методы: Костный мозг трубчатой кости (бедренная кость), 10% бесцветный пищевой желатин, 10% нейтральный формалин, гистологические красители (гематоксилин-эозин), иммуногистохимия: CD34 (кат. 550390, Clone 581, 1:10, BectonDickinson (США)), Retrieval A (pH 6.0) (кат. 550524, BectonDickinson (США)), AntibodyDiluentfor IHC (кат. 559148, BectonDickinson (США)), Anti-Mouse IgG HRP DetectionKit (кат. 551011, BectonDickinson (США)). 10% желатин довести до жидкого состояния на слабом огне. Полученный раствор поместить в теплоизоляционную посуду. Костный мозг соединяем с растворенным желатином в соотношении 1:1. В полученную смесь добавляется 10% формалин в соотношении 1:10 и осторожно перемешиваем. Таким образом, концентрация формалина в смеси костного мозга и желатина достигает около 0,8-1,0%. Все ставится в холодильник при t 2-40С для застывания на 30-60 мин. Из полученного застывшего материала нарезаются блоки, из которых на замораживающем микротоме получали срезы толщиной 4-6 мкм. Срезы помещались на предметные стекла, обработанные полилизином (ThermoScientific). Для гистологического исследования производили окрашивание гематоксилин – эозином. При иммуногистохимическом исследовании срезы обрабатывались Retrieval A (pH 6.0) (кат. 550524, BectonDickinson (США)) для демаскировки антигена согласно протоколу производителя. Антитела CD34 разводили AntibodyDiluentfor IHC (кат. 559148, BectonDickinson (США)) в соотношении 1:10 и наносили на срезы согласно инструкции производителя. Затем срезы обрабатывали системой визуализации с детекцией ДАБ Anti-Mouse IgG HRP DetectionKit (кат. 551011, BectonDickinson (США)), докрасивали гематоксилином и накрывали покровным стеклом. Далее гистологические препараты визуализировались на оптическом микроскопе Olympus CX 41 (Япония).

Результаты: сокращается время приготовления гистологических блоков и срезов. Сохраняется прижизненная фиксация состояние клеток и тканей, за счет применения 0,8-1,0% формалина; исключаются более дорогостоящие уплотнители (парафин, целлоидин, специальный парафин для гистологических исследований, содержащий различные пластические полимеры) и другие расходные материалы при проводке блоков и срезов; модификация позволяет приготовить не менее качественные гистологические препараты, получаемы при других методиках. Заключение: данная модификация получения гистологических срезов костного мозга, имеет ряд преимуществ и может быть использована в научных исследованиях, а также в гистологической, патогистологической практике и позволит более полно изучить прижизненно костный мозг трубчатых костей.

Ключевые слова: желатин, формалин, гистологическая и иммуногистохимическая окраска, костный мозг трубчатых костей.

Summary

In morphological studies, one of the main methods of obtaining information is the histological method as the most known and accurate. Preparation of histological preparations from liquid biological objects is a rather complex and time-consuming process. We faced with the need to prepare histological preparations from the bone marrow of tubular bones and therefore set the purpose.

The aim of the study: to develop a simplified modification of obtaining histological sections of bone marrow.

Materials and methods: tubular bone marrow, 10% colorless food gelatin, 10% neutral formalin, histological dyes (hematoxylin-eosin), immunohistochemistry: CD34 (cat. 550390, Clone 581, 1:10, Becton Dickinson (USA)), Retrieven a (pH 6.0) (cat. 550524, Becton Dickinson (USA)), Antibody Diluent for IHC (cat. 559148, Becton Dickinson (USA)), Anti-Mouse Ig HRP Detection Kit (cat. 551011, Becton Dickinson (USA)). Bring 10% gelatin to a liquid state over low heat. The resulting solution placed in a heat-insulating dish. The bone marrow combined with dissolved gelatin in a ratio of 1:1. In the resulting mixture is added 10% formalin in a ratio of 1: 10 and mix gently. Thus, the concentration of formalin in the mixture of bone marrow and gelatin reaches about 0.8-1.0%. Everything placed in a refrigerator at 2-4 t to harden for 30-60 min. From the obtained hardened material cut in blocks from which on the freezing microtome sections obtained with thickness of 4-6 microns. The sections placed on glass slides treated with polylysin (Thermo Scientific). Hematoxylin – eosin staining performed for histological examination. Immunohistochemical study the sections were processed Retrieven A (pH 6.0) (cat. 550524, Becton Dickinson (USA)) to unmask the antigen according to the manufacturer's Protocol. CD34 antibodies divorced Antibody Diluent for IHC (cat. 559148, Becton Dickinson (USA)) at a ratio of 1: 10 and applied to the slices according to the instructions manufacturer's. Then the slices processed by the visualization system with detection of DUB Anti-Mouse Ig HRP Detection Kit (cat. 551011, Becton Dickinson (USA)), painted with hematoxylin and covered with cover glass. Further histological preparations visualized on an optical microscope Olympus CX 41 (Japan).

Results: reduced preparation time of histological blocks and sections; preserved lifetime fixation state of cells and tissues, through use of 0.5% formalin. Excluded more expensive products (paraffin, celloidin, special paraffin for histological examination, containing different plastic polymers) and other consumables when posting blocks and slices; the modification allows you to prepare no less quality histological specimens obtained by other methods. Conclusion: this modification of obtaining histological sections of liquid biological objects has a number of advantages and can used in scientific research, as well as in histological and pathohistological practice.

Key words: gelatin, formalin, histological and immunohistochemical staining, of bone marrow.

Введение

В экспериментальной и клинической практике основными методами изучения костного мозга являются световая и электронная микроскопия [1]. Чаще всего объектом исследования является гистологический препарат, приготовленный из костного мозга лабораторных животных, а реже, из объектов, полученных во время оперативного вмешательства и инструментального обследования [2]. Изучение костного мозга приобретает все большее значение в связи с развитием новых клеточных технологий и внедрение их в различные области фундаментальной и практической медицины [3,4]. Одним из основных методов получения информации является гистологический метод как наиболее известный и точный для определения морфологических структур ткани костного мозга [5]. Костный мозг имеет жидкую или желеобразную консистенцию в зависимости от морфофункционального состояния. Однако, при получении гистологических препаратов из жидких биологических сред приходится сталкиваться с следующими проблемами: фиксация, сохранение структуры, плотность объекта для последующего приготовления гистологических срезов, максимальное сокращение сроков взятия материалов, минимальное повреждение тканей и создание оптимальных условий для фиксации [7]. Фиксация исключает развитие посмертных изменений в тканях, сохраняет в них биохимические процессы на момент взятия материала, в первую очередь денатурацию белков. Известный факт, что формальдегид присутствует во всех жизненно важных органах и, как промежуточный продукт, принимает участие в ключевых реакциях обмена

на веществ [8]. Исходя из вышеизложенного, мы предлагаем упрощенный способ, удовлетворяющий всем необходимым требованиям. Имеется достаточное количество методик с применением в качестве уплотнителя желатина, но все они обладают существенной сложностью и требуют более длительных затрат времени. Костный мозг трубчатых костей имеет структуру близкую к желатину, что позволяет его использовать при получении гистологического препарата.

Цель: оптимизировать способ получения гистологических срезов костного мозга трубчатых костей.

Материалы и методы

Костный мозг трубчатой кости, 10% бесцветный пищевой желатин, 10% нейтральный формалин, гистологические красители (гематоксилин-эозин), иммуногистохимия: CD34 (кат. 550390, Clone 581, 1:10, BectonDickinson (США)), Retrieven A (pH 6.0) (кат. 550524, BectonDickinson (США)), AntibodyDiluentfor IHC (кат. 559148, BectonDickinson (США)), Anti-MouseIg HRP DetectionKit (кат. 551011, BectonDickinson (США)).

Согласие пациентов

Каждый пациент был проинформирован о наборе материала для проведения исследований, что подтверждалось подписанным информированным согласием. Выполненное исследование соответствует всем этическим принципам медицинских исследований с людьми в качестве субъектов исследований Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (2013).

10% желатин довести до жидкого состояния на слабом огне. Полученный раствор поместить в теплоизоля-

ционную посуду. При ампутации нижней конечности на уровне бедра, в случае невозможности ее сохранения, из полости бедренной кости ложкой Фолькмана извлекался костный мозг в стерильную емкость. Костный мозг соединяем с растворенным желатином в соотношении 1:1. В полученную смесь добавляется 10% формалин в соотношении 1:10 и осторожно перемешиваем. Таким образом, концентрация формалина в смеси костного мозга и желатина достигает около 0,8-1,0%, что очень важно для прижизненного сохранения ткани костного мозга. Все ставится в холодильник при t 2-4 С для застывания на 30-60 мин. Из полученного застывшего материала нарезаются блоки, из которых на замораживающем микротоме получали срезы толщиной 4-6 мкм. Срезы помещались на предметные стекла, обработанные полилизинном (ThermoScientific). Для гистологического исследования производили окрашивание гематоксилин – эозином. При иммуногистохимическом исследовании срезы обрабатывались Retrieval A (pH 6.0) (кат. 550524, Becton Dickinson (США)) для демаскировки антигена согласно протоколу производителя. Антитела CD34 разводились Antibody Diluent for IHC (кат. 559148, Becton Dickinson (США)) в соотношении 1:10 и наносились на срезы согласно инструкции производителя. Затем срезы обрабатывались системой визуализации с детекцией ДАБ Anti-Mouse Ig HRP Detection Kit (кат. 551011, Becton Dickinson (США)), докрашивались гематоксилином и накрывались покровным стеклом. Далее гистологические препараты визуализировались на оптическом микроскопе Olympus CX 41 (Япония) [6].

Результаты: уменьшается период приготовления гистологических блоков и срезов. Сохраняется прижизненная фиксация состояния клеток и тканей, за счет применения 0,5% формалина; исключаются более дорогостоящие уплотнители (парафин, целлоидин, специальный парафин для гистологических исследований, содержащий различные пластические полимеры) и другие рас-

ходные материалы при проводке блоков и срезов; данный способ позволяет приготовить не менее качественные гистологические препараты из костного мозга, получаемы при других методиках.

Результаты и обсуждение

После приготовления гистологических и иммуногистохимических препаратов и их окраски, анализа фиксации и техники приготовления гистологических срезов костного мозга из трубчатых костей, мы получили следующие результаты:

1. Уменьшается период приготовления гистологических блоков и срезов.

2. Сохраняется прижизненная фиксация состояние клеток и тканей, за счет применения 0,5% формалина.

3. Исключаются более дорогостоящие уплотнители (парафин, целлоидин, специальный парафин для гистологических исследований, содержащий различные пластические полимеры) и другие расходные материалы при проводке блоков и срезов.

4. Модификация позволяет приготовить не менее качественные гистологические препараты, получаемы при других методиках (Рис.1 - наобложке).

Заключение

Данная модификация получения гистологических срезов костного мозга трубчатых костей, имеет ряд преимуществ и может быть использована в научных исследованиях, а также в гистологической и патогистологической практике. ■

Николаева Людмила Петровна, к.м.н., ассистент кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого», Россия, Красноярск, e-mail: lpnikolaeva@yandex.ru

Литература:

1. Кулеша Н.В. Актуальные вопросы гистологического исследования при экспертизе живых лиц. *Избранные вопросы судебно-медицинской экспертизы* 2018;17:125-128.
2. Витер В.И., Кунгурова В.В., Хасанянова С.В., Столяров А.П. Учебно-медицинская гистология. Руководство для врачей: изд. 6-е перераб. и доп. 2018.
3. Сисла, Б. Руководство по лабораторной гематологии. Пер. с англ. М.: Практическая медицина; 2011. 352 с. [Sisla, B. Manual of laboratory Hematology. Per. from English. M.: Practical medicine; 2011. 352 s. (In Russian)]
4. Николаева Л.П. Особенности кроветворения в желтом костном мозге. Современные проблемы науки и образования. 2015;6:301 [Nikolaeva LP. Peculiarities of hematopoiesis in the yellow bone marrow of a human. Modern problems of science and education. 2015;6:301 (In Russian)] DOI: 10.17513/spno.130-23914.
5. Мурашов ИС, Волков АМ, Кливер ЕЭ, Казанская ГМ, Савченко СВ, Полонская ЯВ, Каштанова ЕВ, Чернявский АМ. Иммуногистохимическая оценка процесса формирования нестабильной атеросклеротической бляшки. *Вестник судебной медицины*. 2017;2:36-40. [Murashov IS, Volkov AM, Kliver EJe, Kazanskaja GM, Savchenko SV, Polonskaja JaV, Kashtanova EV, Chernjavsckij AM. Immunohistochemical evaluation of forming unstable atherosclerotic plaque. *Bulletin of forensic medicine*. 2017;2:36-40 (In Russian)]
6. Криволапов ЮА. Гистологическое исследование трепанобиопсий костного мозга: избранные лекции; 2011. 134 с. [Krivolapov JuA. Histological examination of bone marrow trepanobiopsy: selected lectures; 2011. 134 s. (In Russian)]

7. *Sujoy, V. Neither Brief Formalin Fixation nor Rapid Tissue Processing Impact the Sensitivity of ER Immunohistochemistry of Breast Core Biopsies / V. Sujoy, M. Nadji, A.R. Morales // AJCP. - 2014. - №141(4). - P. 522-526.*
8. *Nikolaeva L.P. Features of acid – base balance of bone marrow. Acta Medica International. – 2018. T.5. №2. P.55-57.*