

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ

«УТВЕРЖДАЮ»



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

2015 г.

Регистрационный № 009-0215

**МЕТОД ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИПОФУСЦИНА
В ПЕЧЕНИ**

Инструкция по применению

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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
07.05.2015
Регистрационный № 009-0215

**МЕТОД ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИПОФУСЦИНА
В ПЕЧЕНИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: Е. И. Лебедева, д-р мед. наук, проф. О. Д. Мяделец, канд. вет. наук,
доц. А. Л. Лях

Витебск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод гистохимического выявления липофусцина в печени; разработана с целью стандартизации оценки липофусцина в материале гепатобипсии. Применение метода улучшает дифференциальную гистохимическую диагностику смешанных дистрофий печени.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-гастроэнтерологов.

Область применения: гистология, патологическая анатомия, гепатология.
Уровень внедрения: областные и городские патологоанатомические бюро, патологоанатомические отделения диагностических центров.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, 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 %).
2. Ортоксил — 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 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

При взятии материала (биоптаты печени) следует руководствоваться общими противопоказаниями для 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 производят чрескожную биопсию печени под УЗ-контролем, оснащенным линейными и конвексными датчиками 3,5-5,0 МГц. Трепанобиопсию выполняют методом «свободной руки». Столбик ткани длиной до 21 мм для гистологического исследования получают 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 от 17.06.1993 № 111.

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 от 31.10.2006 № 31) и международными рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов в научных и иных целях (Страсбург, 1986).

Подготовка оборудования

Включают автомат для гистологической обработки ткани и устанавливают параметры для работы. Станцию для заливки ткани парафином включают за 1 ч до работы. Для получения срезов монтируют с регулировкой одноразовое лезвие на ротационном микротоме. Предварительно включают водяную баню (температура 50 °С) и нагревательный столик (температура 58 °С).

Гистохимическое исследование

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

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 50 °С. Затем предметные стекла помещают для высыхания на нагревательный столик с температурой 58 °С; при этом заливающая среда хорошо расправляется. Дальнейшую обработку срезов производят обязательно в вытяжном шкафу.

5. Депарафинирование срезов. Гистологические срезы промывают в трех порциях ксилола, двух порциях 96° и одной порции 70° спирта по 3 мин в каждой порции.

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

7. После промывания срезы обрабатывают при комнатной температуре в течение 10 мин смесью равных частей 1 %-го раствора хлорида железа и 1 %-го 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 70° спирте, затем 2 мин в 96° 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 определяются в следующих вариантах: в виде гранул, конгломератов, могут располагаться вокруг крупных капель жира, а также диффузно в соединительной ткани и гепатоцитах, вокруг кровеносных сосудов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано. При гистохимическом исследовании 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 гистохимическом исследовании необходимо строго следовать требованиям настоящей инструкции.