

СОВРЕМЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Авторы: Селезнева Анастасия Алексеевна (Северо-Западный государственный медицинский университет)

Аннотация: Современное патологоанатомическое отделение не обходиться без гистологической лаборатории. Оборудование гистологической лаборатории строго регламентирующийся вопрос, так как от качества обработки и анализа материала зависит жизнь и судьба пациента и его лечащего врача. Наличие соответствующего оборудования, его качество и новизна зависит от места расположения патологоанатомического отделения, его задач и спонсирования. Отсутствие современного оборудования тормозит скорость обработки материалов, создает неблагоприятные условия труда для сотрудников лаборатории, уменьшает качество гистологических препаратов и точность заключения.

Введение

Гистологическая лаборатория – это часть патологоанатомического отделения, которая имеет соответствующую лицензию на владение и пользование медицинскими изделиями, которые необходимы для выполнения работ по проведение гистологического исследования биопсийного и аутопсийного материала [1]. Согласно Приказу МЗ РФ от 24.03.16 № 179н «О Правилах проведения патолого-анатомических исследований» стандартом оснащения гистологической лаборатории патологоанатомического отделения является наличие в данной лаборатории такого оборудования, как: системы обработки тканевых образцов для *in vitro* диагностики (далее - ИВД) автоматической и полуавтоматической, устройства для заливки гистологических образцов, микротомов ротационных и криостатических, водяной бани для расправления тканевых срезов, устройства для подготовки и окрашивания препаратов на предметном стекле микроскопа ИВД, устройства для окрашивания препаратов на предметном стекле микроскопа ИВД, светового микроскопа, термостата для чистых помещений, настольной центрифуги, электронных лабораторных весов, холодильника, моющей машины для лабораторной посуды и прикладного программного обеспечения для лабораторных анализов [2]. Дополнительно при необходимости согласно данному приказу в гистологической лаборатории также могут находиться ультрамикротом, электронный сканирующий/просвечивающий микроскоп, шкаф для хранения микропрепаратов [2].

Наличие соответствующего оборудования, его качество и новизна зависит от места расположения патологоанатомического отделения, его задач и спонсирования. Отсутствие современного оборудования тормозит скорость обработки материалов, создает неблагоприятные условия труда для сотрудников лаборатории, уменьшает качество гистологических препаратов и точность заключения.

Данное оборудование должно храниться в различных комнатах гистологической лаборатории. По СП 2.1.3678-20 "Санитарно-эпидемиологические требования к

эксплуатации помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов, осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг" в гистологической лаборатории должны отдельно находиться комната для приема и регистрации биопсийного и аутопсийного материала, фиксационная, архивы влажного аутопсийного и биопсийного материала и микропрепаратов и блоков биопсий, кабинеты врачей и т.д. Также в данном документе прописан норматив размера помещений для гистологической лаборатории [3].

В гистологической лаборатории проводятся следующие этапы обработки материала:

1) непосредственно лабораторная обработка материала: окончательная фиксация, декальцинация при необходимости, изготовление замороженных блоков, проводка, заливка в парафин, микротомия, окраска. Все эти манипуляции осуществляются медицинским работником со средним медицинским образованием.

2) микроскопическое изучение материала (то есть микроскопия) - проводится врачом-патологоанатомом [2].

Окончательная фиксация

Поскольку в современной лаборатории используется исключительно аппаратные методы проводки, то необходимо окончательно фиксировать материал. Окончательную фиксацию рекомендуют проводить 2-3 часа и помещать в одну корзину исключительно однородный материал [4]. В основном используют два стандартных способа фиксации - химический и физический. Вместо формалина сейчас используют более безопасные вещества, но не уступающие формалину в технических характеристиках, например 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую (HEPES) и глутаминовую кислоты. Внедрение в повседневную практику разнообразных молекулярно-генетических исследований как в патологоанатомическом отделении, так и в других лабораториях, требует дополнительные приемы для фиксации, так как использование формалина не всегда возможно. Для этого существуют специальные вакуумные системы. Примером такой системы является Tissue-Tek Film, оснащенный детектором воздушных пузырьков и системой контроля заключения абсолютно всех препаратов [5,6,7].

Рисунок 1. Аппарат для заключения препаратов под пленку TISSUE-TEK FILM (<https://biovitrum.ru/catalog/smart/apparat-dlya-zaklyucheniya-preparatov-pod-plyenku-tissue-tek-film.html>).

Проводка

Проводка – процесс, который традиционно включает в себя ряд манипуляций, таких как: фиксацию, промывку, обеззараживание и пропитку материала. Сейчас для этого используют аппараты карусельного или процессорного типов [4]. Более традиционными являются аппараты карусельного типа. Такие приборы значительно экономят время и создают дополнительный комфорт при выполнении работ, потому что не требуют постоянного присутствия лаборанта. По сравнению с более старыми

версиями, минимально защищенными от испарения и с небольшой производительностью, современные машины имеют увеличенную производительность за счет двойной загрузки, вакуумную пропитку для улучшения качества проводки. Среди высокотехнологичных тканевых процессоров, представленных на рынке, Российское общество патологоанатомов отмечает Leica ASP300 (Germany), Microm STP420 (Germany), Sakura VIP5 (Japan) и Shandon Hypercenter XP (United Kingdom) [3]. Также современные приборы обладают дисплеями и встроенным мини-компьютером. Особое место в ряду тканевых процессоров занимает гистоконвейер Sakura Tissue-Tek Xpress (Japan). Прибор представляет собой новое в технологии тканевого процессинга техническое решение, основанное на поточном принципе с использованием мягкого микроволнового облучения.

В период 2016–2017 гг. в лаборатории начали дополнительно поставляться вакуумные инфльтрационные гистологические процессоры, например Tissue-Tek® VIP™. Для данных приборов характерна высокая производительность (300 и более кассет за один цикл), наличие закрытого контура, возможность внешнего контроля технологического процесса, функция автоматической подстройки, меньший расход реагентов и много другое. С началом поставки данных приборов произошла оптимизация работы персонала не только

путём сокращения времени проводки материала за счёт двух этапов приготовления микропрепаратов, но и уменьшении контакта персонала с вредными веществами [8]

Заливка

Заливка производится в парафин. А современных аппаратах это производится автоматически. Лаборант подносит кассету к определённому постаменту, нажимает кнопку и аппарат выдаёт необходимую дозу парафина. Далее кассета передвигается на охлаждающую пластину. Такие автоматы существенно облегчают работу лаборанта и уменьшают время заливки, что в целом ускоряет процесс исследования. Соответственно, большинство имеющиеся на рынке приборы характеризуются похожим техническим строением, то есть они оснащены емкостями для парафина, функцией автоматической подачи парафина, горячими камерами для содержания заливочных форм и кассет с материалом, горячими и охлаждаемыми рабочими поверхностями [4].

Ранее парафин для заливки растапливали на паровой бане, и сам процесс происходил вблизи СВЧ-плиты. Материал помещали в бумажную и заливали свежим парафином, остывание парафиновых блоков проходило или в холодной воде, или в холодильнике (+4 градуса) при этом приходилось следить за моментом, когда парафин не застынет, потому что до этого формочки должны плавать в воде. У готовых парафиновых блоков затем срезали лишний парафин вокруг материала. Затем с помощью разогретой специальной лопатки (шпателя) прикрепляли к деревянному блокодержателю, на котором карандашом или ручкой надписывали маркировку объекта. В настоящее время существуют специальные станции для заливки, например, Tissue-Tek® TEC® 5 Tissue Embedding Console System. Прибор включает в себя 2–3

емкости с разогретым парафином [8].

Рисунок 2. Модульная система заливки парафином (заливочный модуль и охлажда- ющая плата) Tissue-Tek® TEC® 5 Tissue Embedding Console System (<https://www.sakuraus.com/Products/Embedding/Tissue-Tek%ae-TEC%e2%84%a2-6.html>).

Микротомия

Для изготовления парафиновых срезов используются специальные приборы – микротомы. Существует две конструкции этих приборов: «санный» микротом и «ротационный». Ротационные механизмы используются и в конструкции современных криомикротомов [4]. От качества выполнения микротомии зависит дальнейшая работа с микропрепаратом, включая его анализ и постановку диагноза. Автоматизированный микротом позволяет ускорить процесс подготовки микропрепарата, предполагает более экономную работу с парафиновыми блоками и стандартизацию данного этапа пробоподготовки [10]. Однако, до сих пор не существует полностью автоматизированного микротома, и по факту они являются полуавтоматическими, поэтому успех микротомии еще во многом зависит от терпения и квалификации лаборанта.

В случаях необходимости экстренного описания препарата, чаще всего интраоперационного, применяют микротом-криостат. Недостатком криостатных срезов является низкое качество гистологических препаратов, нередко со смазанной морфологической картиной, чем при рутинном гистологическом исследовании после проводки. Поэтому необходимо учитывать, что в случаях исследования некоторых опухолей, истинное заключение возможно только при исследовании всего объема опухоли с последующим проведением иммуногистохимических и молекулярно-генетических исследований [11, 12, 14,15,16].

Санные микротомы являются самыми простыми приборами, с весьма ограниченными техническими и функциональными возможностями. В группе механических ротационных микротомов на рынке представлены следующие модели: Leica RM2125 (Germany), Microm HM325 (Germany), Sakura SRM200 (Japan) и Shandon FINESSE 325 (United Kindom) [4,13].

Таблица 1. Характеристика различных видов микротомов.

	Предназначение	Принцип действия	Преимущество
Микротом ротационный	резка полутонких и тонких срезов для световой микроскопии.	маховик вращается на 360 градусов, перемещая образец вертикально к режущей поверхности. Держатель блока установлен на стальной каретке, которая движется вверх и вниз по канавкам с помощью микрометрического винта, при этом нарезающего идеально ровные блоки.	возможность резки больших блоков ткани; легкая адаптация ко всем типам тканей; регулируемый угол среза; большой и тяжелый прибор, поэтому меньше вибрации при резке твердых тканей.
Санный микротом	невропатология и офтальмологическая патология.	держатель блока установлен на стальной каретке, которая не двигается, при этом нож скользит вперед и назад по направляющим. С помощью него можно выполнять подготовку больших образцов, например, залитых в парафин гистологических тканей, которые прикреплены к деревянным брускам.	есть возможность регулировать угол наклона ножа для более легкого разрезания различных участков ткани. Недостаток: более медленный, чем роторный микротом (механический или полуавтоматический).
Криостат	Внедрение методов флуоресцентного окрашивания антител привело к необходимости получения тонких срезов (3-5 мкм) свежемороженой ткани без дефектов кристаллов льда.	Криостат состоит из роторного микротом, помещенного в камеру глубокой заморозки. Камера оборудована стеклянной дверцей, через которую материал проходит внутрь и наружу, а также ультрафиолетовой лампой для обеззараживания камеры от инфекционных возбудителей. Температуру можно регулировать от -10°C до -40°C.	Толщина срезов составляет от 1 мкм до порядка 100 мкм.
Вибрационный микротом	разработан для разрезания тканей, которые не были обработаны или заморожены. Используется в гистохимии ферментов, ультраструктурной гистохимии.	амплитуда вибрации регулируется изменением электрического напряжения, подаваемого на нож. Ткани разрезаются с очень низкой скоростью, чтобы избежать дезинтеграции.	эти точные инструменты поддерживают морфологию клеток, активность ферментов, а также жизнеспособность клеток ткани

Примером, микротом, который стоит в современной лаборатории может быть Ротационный полуавтоматический микротом [4]. Он используется в рутинной практике для изготовления парафиновых срезов высокой точности, может быть применен в любых областях и для более жестких образцов, например, кальцифицированная кость. На дисплее отображается целый ряд параметров, позволяющих контролировать толщину среза, выравнивание (тримминг), подсчет срезов и т. д. У современных микротомов для правильного разглаживания супертонкого среза есть свой бассейн, в котором срез расплавляется за счет сил поверхностного натяжения.

Окраска

На данном этапе для окраски используют специальные приборы – автостейнеры. Применение автоматических систем окрашивания способствует унифицированную условий окрашивания, примерно одинаковому качества и способности обработать большее число материала. Автостейнеры на рынке представлены моделями Leica ST5010 (Germany), Leica ST5020 (Germany), Microm HMS740 (Germany), Microm HMS760X (Germany), Sakura Prisma (Japan) и Shandon Varistain 24-4K (United Kindom). С целью соблюдения корректности из сравнительной характеристики исключены более продвинутые модели Leica ST5020 (Germany) и Microm HMS760X (Germany) [4]. Современные системы окрашивания обычно имеют несколько программ в своей памяти, что очень удобно, так как лаборанту не надо каждый раз вбивать все данные. Кроме этого, данные приборы достаточно безопасны из-за системы фильтров. Наиболее востребованными являются окраска гематоксилин-эозини иммуногистохимия, для которой вместо красителей используют антитела, для которых так же существуют автоматизированные устройства для окраски микропрепаратов [17, 18]

Заключение под предметное стекло

Заключение под стекло, хоть и кажется незначительным этапом, однако является одним из основополагающих для дальнейшего микроскопического исследования. Ошибка в заключении под стекло равняется наличию артефактов и неправильном диагнозе или невозможности его постановки. Современная наука уже пытается найти различные технологические подходы и решения, позволяющие минимизировать количество ошибок, но полностью автоматизировать процесс все еще не получилось. Пока полной автоматизации не существует, можно решить проблему иначе:

- создание специализированных, полностью укомплектованных цифровых лабораторий. Такой путь дает наибольшую эффективность в крупных медицинских центрах и в ряде крупных частных лабораторий, поскольку требует соответствующего финансирования и доступности подвоза материала [10].
- создание протоколов пробоподготовки и их оцифровка, то есть заполнение этих протоколов в цифровом виде по мере выполнения, и возможность их контроля и внесения корректировок.

Но оба этих варианта требуют наличие специальной информационной системы, которая будет включать в себя как минимум фото- и видеофиксацию процессов вырезки, отображение протоколов для лаборантов при проведении всех этапов пробоподготовки, систему идентификации гистоматериалов (формирование QR-кодов для кассет, стекол), отсканированных изображений, печатей штрихкодов. [10, 19, 20].

На современном этапе возможны полуавтоматические способы заключение под стекло препарата. Существует два различных технических способа данной процедуры – заключение окрашенного среза под покровное стекло с использованием специализированных гистологических монтирующих сред (традиционное техническое решение), и заключение окрашенного среза под специальную пленку без

использования монтирующих сред (совместная разработка Sakura, описанная выше). Однако выше не был описан минус приборов, заключающих под пленку. При всех положительных свойствах поверхность микропрепарата, покрытого полимерной пленкой, в отличие от покровного стекла, никогда не бывает идеально ровной, что не дает необходимого точного расстояния от поверхности предметного стекла до поверхности пленки (0,17-0,20 мм) [4, 5, 6, 7].

Микроскопия

Микроскоп является долгожителем в гистологических лабораториях. Современные микроскопы обладают большим увеличением, чем их старшие братья, а также сейчас существуют микроскопы с фотоаппаратами и микроскопы для совместного просмотра. Микроскоп с фотоаппаратом может иметь или собственный дисплей или же быть подключен к стационарному монитору, на который выводится изображение. Например, Levenhuk MED D10T LCD – цифровой микроскоп, который имеет камеру с 5-мегапиксельным сенсором и ЖК-экраном. Специальная программа в данном микроскопе дает возможность редактировать отснятый материал. Еще существуют системы для совместного просмотра для микроскопии. Система микроскопа Nexcore с совместным обзором для нескольких человек широко используется в обучении, экспериментальном обучении и патологической диагностике. Данная система Nexcore может быть расширена на 2-10 человек. Лаборатории также оснащены микроскопами для традиционного исследования препаратов, а также сканирующими микроскопами по типу Leica SCN 400 и программно-аппаратным комплексом для развивающейся «цифровой патологии». Эта современная система позволяет создавать точные цифровые копии (производительность 400 копий в сутки) гистологических препаратов и обеспечивает простой и удобный круглосуточный, онлайн доступ для специалистов из других организаций, в том числе из других городов или стран. Консультант получает контролируемый (пароль-опосредованный) доступ через интернет к полностью оцифрованным гистологическим препаратам. Такой подход исключает потери времени при транспортировке стекол и вероятность их повреждения, при этом повышая качество и скорость диагностики. Стандартизированные условия оцифровки и автоматизированные протоколы анализа гистологических, цитологических, иммуногистохимических препаратов повышают объективность постановки диагноза [14, 21, 22].

Заключение.

Современное оборудование гистологической лаборатории достаточно обширно и высокотехнологично, однако и в нем существуют различные минусы. К тому же существует огромная проблема узаконивания новых аппаратов. Например, возможна почти полностью машинизированная обработка материала [10]. Поступающий материал подвергается макроскопическому описанию при помощи цифровой системы фото- и видеоисследования MacroPATH D. Данная программа способна автоматически определять размер объекта, разделять изображения препарата на секции, добавлять подписи и текстовые комментарии. Данная система связана с рабочим местом врача-патологоанатома, откуда он ей управляет и может делать дополнительные, в том числе аудио, пометки. После макроскопического фото-

и видеоисследования, формирования гистологических кассет, материал фиксируется на полностью автоматизированной системе FixMATE. После «контролируемой» фиксации биологический материал подвергается автоматической дегидратации и инфильтрации в парафине на аппарате для проводки тканей Excelsior для дальнейших медицинских исследований. Однако данная система не прописана ни в одном разрешающем документе Российской Федерации, хотя она бы в достаточной степени увеличила бы безопасность труда работников гистологической лаборатории.