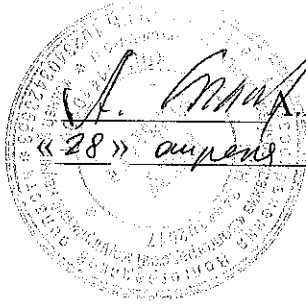


**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор  
ГБУ ВМНЦ



*А. А. Спасов*  
«28» апреля 2017 г.

А.А. Спасов

2017 г.

**«СОГЛАСОВАНО»**

Председатель комитета  
здравоохранения  
Волгоградской области



*В. В. Шкарин*

«10» апреля 2017 г.

В.В. Шкарин

2017 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОГО  
ИССЛЕДОВАНИЯ  
МАТЕРИАЛА НЕФРОБИОПСИЙ  
(для врачей патологоанатомов и врачей нефрологов)**

Разработчики:  
Зав. лабораторией  
патоморфологии, иммуногистохимии  
и канцерогенеза,  
д.м.н., профессор А.В. Смирнов;  
С.н.с. лаборатории  
патоморфологии, иммуногистохимии  
и канцерогенеза,  
д.м.н., доцент Г.Л. Снигур;  
Н.с. лаборатории  
патоморфологии, иммуногистохимии  
и канцерогенеза,  
к.м.н., доцент М.В. Шмидт;  
Лаборант лаборатории  
патоморфологии, иммуногистохимии  
и канцерогенеза, И.В. Гайворонская

Волгоград 2017 г.

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>	
<b>ТРЕБОВАНИЯ И УСЛОВИЯ ДЛЯ ОПТИМАЛЬНОГО РЕЗУЛЬТАТА</b>	
<b>БИОПСИЙНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ:</b> .....	3
<b>РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ (СМ):</b> .....	3
<b>СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ (ПРОВОДКА)</b> .....	5
<b>ПРОТОКОЛ РЕЗКИ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ</b> .....	6
<b>ОКРАСКА НЕФРОБИОПСИИ ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ ПО</b>	
<b>ХАРРИСУ</b> .....	7
<b>PAS-РЕАКЦИЯ</b> .....	8
<b>ОКРАСКА ТРИХРОМОМ ПО МАССОНУ</b> .....	10
<b>ИМПРЕГНАЦИЯ СОЛЯМИ СЕРЕБРА ПО ДЖОНСУ</b> .....	12
<b>ОКРАСКА КОНГО-КРАСНЫМ ЩЕЛОЧНЫМ</b> .....	14
<b>РЕКОМЕНДАЦИИ К ПРОВЕДЕНИЮ</b>	
<b>ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО/ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО</b>	
<b>ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	16
<b>ПРОТОКОЛЫ ОКРАСОК</b> .....	17
<b>ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ КРИОСТАТНОЙ ТКАНИ:</b> .....	19
<b>ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ТКАНИ ФИКСИРОВАННОЙ</b>	
<b>ФОРМАЛИНОМ С ФЕРМЕНТНОЙ ДЕМАСКИРОВКОЙ АНТИГЕНОВ:</b> .....	20
<b>ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ</b> .....	21
<b>РЕКОМЕНДАЦИИ К ПРОВЕДЕНИЮ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ</b>	
<b>МИКРОСКОПИИ (ЭМ)</b> .....	24
<b>СОРТИРОВКА И ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА НЕФРОБИОПСИИ</b> .....	24
<b>ПРОТОКОЛ ОКРАСКИ</b> .....	26
<b>АЛГОРИТМ КОМПЛЕКСНОЙ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ</b>	
<b>НЕФРОБИОПСИИ</b> .....	30

## **ТРЕБОВАНИЯ И УСЛОВИЯ ДЛЯ ОПТИМАЛЬНОГО РЕЗУЛЬТАТА БИОПСИЙНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ:**

- Адекватный объем полученного материала.
- Технически хорошо подготовленные препараты для всех видов исследования.
- Полная подробная клиническая информация.
- Врач-патологоанатом, обладающий знаниями и опытом в области патологии почек.
- Четко сформулированное и информативное гистологическое описание и заключение ориентированное на клинициста.
- Нефролог обладающий необходимыми познаниями в патоморфологии почки, умеющий проводить клинико-морфологические сопоставления с целью своевременной коррекции лечения.

Рекомендуемый размер биопсийной иглы: игла 16g обеспечивает забор большего количества клубочков и адекватного в диагностическом отношении образца ткани, меньшего количества фрагментов и меньшей потребности повторять биопсию, не повышая риск осложнений манипуляции по сравнению с использованием иглы 18g (Am J Transplant. 2005;5:1992-6; Am J Nephrol. 2013;37:249-54; Nephrology. 2013;18:525-30).

Например: 18g, диаметр 1,27 мм (примерно на 25% меньше ткани), 16g, диаметр 1,65 мм

## **РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ (СМ):**

- Фиксация: свежий 10% нейтральный буферный формалин или 4% параформальдегид.
- Нарезка: срезы толщиной 2-3 микрона на 10-20 последовательных уровнях.
- Окраска: в альтернирующем режиме (на каждом уровне) гематоксилин-эозин, PAS(ШИК)-реакция, трихром по Массону, импрегнация солями серебра по Джонсу, конго-красный щелочной (Таб. 1.).

В лаборатории необходимо изготавливать многоуровневые серийные срезы с множественными окрасками на каждом уровне.

Характеристика тинкториальных свойств почки в зависимости от методики окраски/импрегнации. Таблица 1.

Название окраски	Базальная мембрана	Мезангиальный матрикс	Интерстициальный коллаген	Цитоплазма клеток в норме	Иммунокомплексные депозиты	Инсудативные изменения («гИАлиноподобные»)	Склероз / фиброз	Фибрин / фибриноид	Амилоид	Цилиндры белка Tamm-Horsfall
Конго красный	Негативная	Негативный	Негативный	Негативная	Негативные	Негативные	Негативные	Негативные	Красный	Негативные
Трихром по Массону	Синяя	Синий	Бледно-голубой	Цикламеновый оттенок, без красного	Красные (чувствительность низкая)	Красные	Синий	Красный	Бледно-голубой	Бледно-голубые
PAS(ШИК)-реакция	Позитивная (цвет фуксии, красно-цикламеновый)	Позитивный	Негативные / слабо-позитивные	Негативные / слабо-позитивные	Негативные / слабо-позитивные	Позитивные	Позитивные	Слабо позитивный	Негативный / слабо позитивный	Позитивные
Импрегнация солями серебра по Джонсу	Позитивная (черный цвет)	Позитивный	Негативный	Негативная	Негативные	Негативные	Позитивные	Негативный	Негативный / слабо позитивный	Негативные

## **СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ (ПРОВОДКА)**

1.0 ЦЕЛЬ / ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ: После параформальдегидной или формалиновой (или другой альтернативной) фиксации и перед заливкой в парафин и резкой ткань должна быть обезвожена и пропитана парафином.

2.0 ОБРАЗЕЦ: Ткань, фиксированная в 4% параформальдегиде или 10% нейтральном буферном формалине. Материал игольной биопсии следует фиксировать путем осторожного постоянного взбалтывания (можно в шейкере) в течение, как минимум, 90 минут, прежде чем запустить в процесс проводки. Допускается оставлять образец ткани в параформальдегиде или формалине до проводки в течение нескольких дней (оптимально 24 часа, но не более 48 часов!!!). Длительное (более 1 недели) нахождение ткани в фиксаторе приводит к получению более сухого и более сложного для технической обработки образца.

### 3.0 МАТЕРИАЛЫ / ОБОРУДОВАНИЕ:

3.1 Автоматический процессор или ручная проводка.

3.2 Градуированные спирты: абсолютный этанол, 95% этанол, 70% этанол.

3.3 Ксилол.

3.4 Заливочный парафин мягкого типа.

4.0 БЕЗОПАСНОСТЬ: Общие меры предосторожности.

### 5.0 ОБОРУДОВАНИЕ, НАСТРОЙКА И ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:

Автоматический процессор программируется в соответствии с размером тканевых фрагментов.

5.1 Автоматический процесс должен содержаться в чистоте и ежегодно проверяться сертифицированным специалистом-технологом.

### 6.0 ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ:

6.1 Кассеты маркируются фамилией пациента и номером гистологического исследования.

6.2 Ткань фиксируется в 4% параформальдегиде в течение, как минимум, 90 минут или в 10% формалине в течение 1 часа. Если в материале биопсии представлены мелкие фрагменты, его можно обернуть специальной микропористой сетчатой тканью, чтобы их не потерять в процессе проводки. Длинные столбики можно разделить поперек на более короткие, примерно 1,0-1,5 см, для более удобной заливки и дальнейшей резки.

6.3 Кассеты укладываются в металлический контейнер и погружаются в 70% спирт (однократно), 95% спирт (двухкратно) и абсолютный спирт (трехкратно) на время, которое определено программой процессора.

Для ручной проводки – каждый этап по 10 минут.

6.4 Затем ткань пропитывается жидким парафином в двух разных емкостях.

6.5 Теперь тканевой образец готов к заливке в парафин и резке (ориентация нефробиоптата продольная).

## **ПРОТОКОЛ РЕЗКИ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

1.0 ЦЕЛЬ / ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ: Получить серийные срезы толщиной 2 микрона.

2.0 МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА: Все специалисты (технологи, патологоанатомы) каждый на своем уровне выполняют оценку и анализ полученного материала.

3.0 ОБРАЗЕЦ: Фрагмент (столбик) ткани почки, фиксированный в 4% параформальдегиде или 10% нейтральном буферном формалине, прошедший процесс гистологической проводки и залитый в парафин.

4.0 МАТЕРИАЛЫ / ОБОРУДОВАНИЕ:

4.1 Парафиновый блок с заключенным в него образцом ткани.

4.2 Микротом (лучше роторный с водопадом).

4.3 Водяная баня для расправления парафиновых срезов.

4.4 Предметные стекла.

5.0 БЕЗОПАСНОСТЬ: Общие меры предосторожности.

6.0 ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ:

6.1 Получить серийные срезы толщиной 2 микрона методом ленточной резки парафинового блока, укрепленного в микротоме. «Ленты» срезов поместить в стандартную водяную баню, разделить срезы внутри «ленты» и выловить их, распределяя на серийных предметных стеклах. Очень важно сохранять серийную ориентацию срезов.

Как только в срезах покажется ткань почки, начать вылавливать их на незаряженные предметные стекла, например «SuperFrost». Желательно проверять каждый срез с помощью фазового-контрастного микроскопа и, как только покажется первый клубочек, распределять срезы на стеклах последовательно для протокола окраски серийных срезов (см. ниже).

6.2 Резать ткань с клубочками, распределяя их последовательно. Один их подходов следующий:

1) сделать 13 срезов;

2) уровни 4, 5, 9 и 10 поместить на положительно заряженные предметные стекла и оставить неокрашенными для возможных дополнительных ИГХ-окрасок;

3) на уровнях 1, 2, 3 и 6, 7, 8 и 11, 12, 13 выполнить окраски следующим образом – гематоксилин и эозин на 1, 6, 11; PAS на 2, 7, 12; импрегнация солями серебра по Джонсу на 3, 8, 13; трихром по Массону выполнить на одном из дополнительных срезов.

Примечание: Варианты последовательности и количества срезов

могут отличаться в разных лабораториях. Основным принципом резки и распределения срезов является последовательность специализированных окрасок с вкраплением одного или двух промежуточных неокрашенных срезов, за которыми следует вторая последовательность с набором специализированных окрасок, а в большинстве лабораторий еще третья и четвертая такие же последовательности. Этот подход позволяет оптимально оценить ткань на разных уровнях.

6.3 Тщательно высушить срезы для предотвращения смыва срезов со стекол.

6.4 Промокнуть водяную баню бумажным полотенцем каждый раз перед нарезкой другого парафинового блока, удаляя срезы с поверхности воды, чтобы избежать попадания «инородного» среза на стекло.

## **ОКРАСКА НЕФРОБИОПСИИ ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ ПО ХАРРИСУ.**

1.0 ЦЕЛЬ / ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ: Визуализировать ткань микроскопически.

2.0 ОБРАЗЕЦ: Фрагмент (столбик) ткани почки, фиксированный в 4% параформальдегиде или 10% нейтральном буферном формалине, залитый после проводки в парафин и нарезанный по 2 микрона.

### **3.0 ОСНАЩЕНИЕ И РЕАКТИВЫ:**

Все реактивы хранятся согласно инструкциям производителя.

#### **3.1 Стоковые (матричные) растворы (хранятся):**

- Модифицированный гематоксилин Харриса.
- Просветлитель II.
- Эозин "Y", 1% раствор (1 г эозина "Y" на 100 мл дист. воды).
- Флоксин "B", 1% раствор (1 г флоксина "B" на 100 мл дист. воды).

#### **3.2 Рабочие растворы:**

Раствор эозина-флоксина:

- Эозин "Y" 100 мл.
- Флоксин "B" 10 мл.
- Спирт 95% 780 мл.
- Ледяная уксусная кислота 4 мл.

Приготавливать рабочие растворы по мере необходимости. Менять рабочие растворы не реже одного раза в неделю.

### **4.0 БЕЗОПАСНОСТЬ: Общие меры предосторожности.**

### **5.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА: В ткани имеется внутренний контроль**

- ядра синего цвета, цитоплазма красного или розового цвета.

#### 6.0 ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ:

6.1 Депарафинировать срезы, погрузив в ксилол, 4 смены по 2 минуты каждая.

6.2 Промыть срезы, последовательно погружая в 4 смены градуированных спиртов: 2 смены абсолютного спирта, 1 смена 95% спирта и 1 смена 70% спирта; по 2 минуты в каждой смене.

6.3 Хорошо промыть в проточной воде.

6.4 Окрасить модифицированным гематоксилином Харриса в течение 3 минут 30 секунд.

6.5 Промыть срезы в теплой проточной воде в течение 1 минуты.

6.6 Поместить срезы в «просветлитель II» на 1 минуту.

6.7 Промыть в теплой проточной воде в течение 1 минуты.

6.8 Окрасить срезы эозином «У» в течение 4 минут.

6.9 Обезводить в абсолютном спирте, 4 смены по 1-2 минуты каждая.

6.10 Просветлить в ксилоле, 4 смены по 1-2 минуты каждая.

6.11 Заключение срезы, используя покровные стекла и заключающую среду.

#### 7.0 ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ИХ ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ:

- оценка общей структуры ткани почки.

- оценка адекватности материала нефробиопсии.

- исключение наличия опухолевого поражения.

(!)- Не позволяет оценить состояние ГБМ, мезангия, ТБМ и интерстиция.

(!)- Существенно преувеличивает степень клеточности клубочков.

(!)- Не позволяет достоверно дифференцировать склероз, фиброз, амилоидоз, «гиалиноз».

Ядра - темно-фиолетовые или синие, цитоплазма - розовая.

#### PAS-РЕАКЦИЯ

1.0 ЦЕЛЬ / ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ: Для качественной последовательной оценки гистологических срезов на наличие грибов и других PAS-позитивных элементов ткани.

2.0 ОБРАЗЕЦ: Фрагмент (столбик) ткани почки, фиксированный в 4% параформальдегиде или 10% нейтральном буферном формалине, залитый после проводки в парафин и нарезанный по 2 микрона; срезы помещены на положительно заряженные предметные стекла (см. выше процесс проводки).



### 3.0 ОСНАЩЕНИЕ И РЕАКТИВЫ:

Все реактивы хранятся согласно инструкциям производителя.

3.1 Раствор периодической кислоты (10г периодической кислоты на 1'000мл дистиллированной воды).

3.2 Реактив Шиффа.

3.3 Модифицированный гематоксилин Харриса.

3.4 Просветлитель II.

4.0 БЕЗОПАСНОСТЬ: Общие меры предосторожности.

5.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА: Для каждой PAS-реакции производится позитивный контроль. В ткани почки имеется внутренний контроль (например, щеточная кайма цитоплазмы эпителия извитых канальцев, внеклеточный матрикс мезангиального пространства клубочков).

### 6.0 ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ:

6.1 Депарафинировать срезы, погрузив в ксилол, 4 смены по 2 минуты каждая.

6.2 Трижды промыть срезы в дистиллированной воде.

6.3 Окислить срезы, погрузив в раствор периодической кислоты на 10 минут.

6.4 Трижды промыть срезы в дистиллированной воде.

6.5 Поместить срезы в реактив Шиффа на 15 минут.

6.6 Промыть срезы в проточной воде в течение 2-3 минут или до чистой воды.

6.7 Выполнить контрастирующее окрашивание гематоксилином Харриса в течение 3 минут 30 секунд.

6.8 Поместить срезы в проточную воду на 1 минуту.

6.9 Поместить срезы в «просветлитель II» на 1 минуту.

6.10 Хорошо промыть в проточной воде.

6.11 Обезводить срезы в абсолютном спирте, 4 смены по 2 минуты каждая.

6.12 Просветлить срезы, погрузив в ксилол, 4 смены по 2 минуты каждая.

6.13 Заклочить срезы, используя покровные стекла и заключающую среду.

Окраску можно удалить, поместив срезы в 0,5% водный раствор перманганата калия на 5 минут. Промыть в проточной воде в течение 5 минут и поместить в 5% водный раствор щавелевой кислоты на 5 минут. Хорошо промыть в проточной воде.

### 7.0 ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ИХ ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ:

- Оценка площади мезангиального пространства.
- Оценка количества мезангиального матрикса.
- Оценка состояния эпителия канальцев.

- Оценка степени атрофии канальцев.
- Оценка состояния стенок сосудов.

(!) Позволяет заподозрить ранние проявления амилоидоза.

PAS-позитивными (от розового до цикламеново-красного, или цвета фуксии) могут быть следующие структуры: гликоген, муцин, гиалуроновая кислота, ретикулин, фибрин, коллоид, инсудативные изменения (в стенках артериол, капиллярах клубочков), гранулярные клетки стенок почечных артериол, большинство базальных мембран, коллоид щитовидной железы и гипофиза, отложения амилоида и другие элементы.

Ядра: синие.

Грибы: красные.

## ОКРАСКА ТРИХРОМОМ ПО МАССОНУ

1.0 ЦЕЛЬ / ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ: Ацидофильные тканевые элементы связываются с кислыми красителями. С помощью растворов фосфорномолибденовой и/или фосфорновольфрамовой кислот эти красители удаляются из коллагена, но не из цитоплазмы. После этого коллаген окрашивается анилиновым синим.

2.0 ОБРАЗЕЦ: Фрагмент ткани почки, фиксированный в 4% параформальдегиде или 10% нейтральном буферном формалине, залитый после проводки в парафин и нарезанный по 2 микрона.

### 3.0 ОСНАЩЕНИЕ И РЕАКТИВЫ:

Все реактивы хранятся в соответствии с инструкциями производителя.

#### 3.1 Раствор Боуэна:

- Насыщенный раствор пикриновой кислоты 75.0 мл.
- Формальдегид 37-40% 25.0 мл.
- Ледяная уксусная кислота 5.0 мл.

#### 3.2 Железный гематоксилин Вейгерта:

- Раствор «А»: Гематоксилин 1.0 г.
- 95% спирт 100.0 мл.
- Раствор «Б»: Водный 29% раствор хлорида железа 4.0 мл.
- Дистиллированная вода 95.0 мл.
- Соляная кислота концентрированная 1.0 мл.
- Рабочий раствор: растворы «А» и «Б» в соотношении 1 : 1.

3.3 Раствор "Biebrich Scarlet" и кислого фуксина (может храниться): "Biebrich Scarlet", 1% водный раствор 90.0 мл

- Кислый фуксин, 1% водный раствор 10.0 мл.
- Ледяная уксусная кислота 1.0 мл

#### 3.4 Фосфорномолибденовая-фосфорновольфрамовая кислота:

- Фосфорномолибденовая кислота (хранить в прохладном месте)

5.0 г.

- Дистиллированная вода 200.0 мл.
- 3.5 Раствор анилинового синего (может храниться):
  - Анилиновый синий 2.5 г.
  - Уксусная кислота 2.0 мл.
  - Дистиллированная вода 200.0 мл.
- 3.6 Уксусная кислота, 1% водный раствор:
  - Ледяная уксусная кислота 2.0 мл.
  - Дистиллированная вода 100.0 мл.

4.0 БЕЗОПАСНОСТЬ: Общие меры предосторожности.

5.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА: Подготовленный позитивный контроль с фуксинофильными тканевыми элементами. Почти все нормальные ткани содержат коллаген, который должен воспринять анилиновый синий. Примеры тканей с обилием коллагена - почка с нефросклерозом.

#### 6.0 ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ:

6.1 Депарафинировать срезы, погрузив в 4 смены ксилола, по 2 минуты каждая.

6.2 Обезводить срезы в 2 сменах абсолютного спирта (по 2 минуты каждая), 1 смене 95% спирта 2 минуты, 1 смене 70% спирта 2 минуты.

6.3 Протравить срезы в фиксаторе Боуэна в течение 1 часа при 50-60° С.

6.4 Промыть срезы осторожно под проточной водой до исчезновения в промывной воде желтизны.

6.5 Трижды сполоснуть в дистиллированной воде.

6.6 Окрасить срезы железным гематоксилином Вейгерта, погрузив в рабочий раствор на 10 минут.

6.7 Сполоснуть в теплой воде 15 минут.

6.8 Окрасить срезы в растворе "Biebrich Scarlet" и кислого фуксина, погрузив в него на 15 минут.

6.9 Погрузить срезы в раствор форфорномолибденовой-фосфорновольфрамовой кислоты на 15 минут; затем перемешать раствор взбалтыванием.

6.10 Погрузить срезы в раствор анилинового синего на 15 минут.

6.11 Сполоснуть в дистиллированной воде 3 минуты.

6.12 Погрузить срезы в 1% водный раствор уксусной кислоты на 1-3 минуты; затем перемешать раствор взбалтыванием.

6.13 Трижды сполоснуть в дистиллированной воде.

6.14 Обезводить срезы в абсолютном спирте, 4 смены по 2 минуты каждая.

6.15 Просветлить срезы, погрузив в ксилол, 4 смены по 2 минуты каждая.

6.16 Заключить срезы, используя покровные стекла и заключающую среду.

#### 7.0 ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ.

- Оценка мезангиального пространства и количества матрикса.
- Выявление белковых депозитов.
- Оценка степени интерстициального фиброза и фиброза интимы артерий.

(!) Позволяет заподозрить ранние проявления амилоидоза.

*черно-бурый* – ядра.

*сине-голубой цвет* – базальные мембраны клубочков, канальцев и сосудов, мезангиальный матрикс, коллаген (фиброз), слизь.

*пурпурно-красный* – цитоплазма, кератин, мышечные волокна, межклеточные волокна, плазменные белки, эритроциты, белковые депозиты.

### **ИМПРЕГНАЦИЯ СОЛЯМИ СЕРЕБРА ПО ДЖОНСУ**

1.0 ЦЕЛЬ / ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ: Нитрат серебра окрашивает углеводы в черный цвет, подчеркивая внеклеточный матрикс и базальные мембраны.

2.0 ОБРАЗЕЦ: Фрагмент ткани почки, фиксированный в 4% параформальдегиде или 10% нейтральном буферном формалине.

#### 3.0 ОСНАЩЕНИЕ И РЕАКТИВЫ:

Все реактивы хранятся в соответствии с инструкциями производителя.

3.1 Хлорид золота, 1% водный раствор:

- Хлорид золота 1.0 г.
- Дистиллированная вода 100.0 мл.

3.2 Периодическая кислота, 1% водный раствор:

- Перйодная кислота 1.0 г.
- Дистиллированная вода 100.0 мл.

3.3 Метенамин (гексаметилентетрамин), 3% водный раствор:

- Гексаметилентетрамин 3.0 г.
- Дистиллированная вода 100.0 мл.

3.4 Нитрат серебра, 5% водный раствор:

- Нитрат серебра 5.0 г.
- Дистиллированная вода 100.0 мл.

3.5 Бура, 5% водный раствор:

- Тетраборат натрия 5.0 г.
- Дистиллированная вода 100.0 мл.

3.6 Хлорид золота, 0,2% водный раствор:

- Хлорид золота 1% 10.0 мл.
- Дистиллированная вода 40.0 мл.

3.7 Стоковый (матричный) раствор «Метенамин-Серебро» (M.S.):

- Метенамин, 3% раствор (см. п. 3.3) 100.0 мл.
- Нитрат серебра, 5% раствор (см. п. 3.4) 5.0 мл.

- 3.8 Рабочий раствор M.S.:
- Стоковый раствор M.S. (см. п. 3.7) 15.0 мл.
  - Дистиллированная вода 15.0 мл.
  - Бура, 5% раствор (см. п. 3.5) 3.0 мл.
- 3.9 Модифицированный гематоксилин Харриса.
- 3.10 Просветлитель II.

4.0 БЕЗОПАСНОСТЬ: Общие меры предосторожности.

5.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА: Ткань почек, также как и другие ткани с внеклеточным матриксом, имеет свой внутренний контроль. Базальные мембраны клубочков и канальцев окрашиваются в черно-коричневый цвет.

#### 6.0 ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ:

- 6.1 Депарафинировать срезы, погрузив в ксилол, 4 смены по 2 минуты каждая.
- 6.2 Обезводить срезы в 2 сменах абсолютного спирта (по 2 минуты каждая), 1 смене 95% спирта 2 минуты, 1 смене 70% спирта 2 минуты.
- 6.3 Хорошо промыть в дистиллированной воде, 3 смены по 5-6 секунд каждая.
- 6.4 Погрузить срезы в 1% раствор йодной кислоты на 10 минут.
- 6.5 Хорошо промыть в дистиллированной воде, 3 смены по 5-6 секунд каждая.
- 6.6 Погрузить срезы в сосуд Коплина с рабочим раствором M.S.
- 6.7 Поместить сосуд Коплина в водяную баню на 10 минут при 70° С. Поместить еще один сосуд Коплина с дистиллированной водой в водяную баню для промывки и проверки окрашивания срезов.
- 6.8 Периодически проверять с помощью микроскопа ход окраски во всех срезах на предмет окрашивания базальных мембран (основной критерий — окрашивание гломерулярных базальных мембран).
- 6.9 6.9 Когда мембраны достаточно окрашены, сполоснуть слайды в 6 сменах дистиллированной воды.
- 6.10 Тонировать срезы, погрузив на 1 минуту в 0,2% раствор хлорида золота.
- 6.11 Промыть в дистиллированной воде, 3 смены по 5-6 секунд каждая.
- 6.12 Убрать лишние металлы, погрузив срезы в 5% раствор тиосульфата натрия на 1 минуту.
- 6.13 Быстро сполоснуть срезы в проточной воде в течение 5 секунд.
- 6.14 Окрасить гематоксилином Харриса в течение 3 минут 30 секунд.
- 6.15 Сполоснуть в теплой проточной воде в течение 1 минуты.

- 6.16 Поместить срезы в «просветлитель II» на 1 минуту.  
6.17 Сполоснуть в проточной воде в течение 1 минуты.  
6.18 Выполнить контрастирующее окрашивание срезов эозином в течение 4 минут.  
6.19 Обезводить в абсолютном спирте, 4 смены по 2 минуты каждая.  
6.20 Просветлить в ксилоле, 4 смены по 2 минуты каждая.  
6.21 Заключить срезы, используя покровные стекла и заключающую среду.

## 7.0 ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ИХ ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ:

- Оценка состояния базальных мембран клубочков, канальцев и сосудов.
- Оценка количества мезангиального матрикса.

*Черно-бурый цвет* – базальные мембраны клубочков, канальцев и сосудов, мезангиальный матрикс, коллаген (фиброз), эластин.

(!) Позволяет заподозрить ранние проявления амилоидоза.

Ядра – синие.

Цитоплазма – розовая.

Эритроциты – красные.

8.0 ПРИМЕЧАНИЕ: Чтобы откорректировать переокрашенный метенамин, используйте 0,5% раствор феррицианида калия (красная кровяная соль). Быстро окуните в него стекло со срезами 1-2 раза, проверьте результат, используя микроскоп. Повторяйте процедуру до нужного результата.

NB! Это выполняется до этапа тонирования хлоридом золота!

## ОКРАСКА КОНГО-КРАСНЫМ ЩЕЛОЧНЫМ

1.0 ЦЕЛЬ /ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ: Выявление амилоида в ткани.

2.0 ОБРАЗЕЦ: Парафиновые срезы толщиной 6 мкм. Если парафиновые срезы недоступны, то замороженные срезы толщиной 2 мкм, фиксированные в ацетоне в течение 2 минут.

### 3.0 ОСНАЩЕНИЕ И РЕАКТИВЫ:

Все реактивы хранятся в соответствии с инструкциями производителя.

3.1 Хлорид натрия, насыщенный спиртовой раствор:

- Абсолютный спирт -200 мл.
- Дистиллированная вода - 50 мл.
- Хлорид натрия - 6.25 г.

3.2 Конго-красный, насыщенный щелочной спиртовой раствор:

- Насыщенный спиртовой раствор хлорида натрия 250 мл Конго-красный сухой 5 г.

3.3 Гидроксид натрия, 1% водный раствор:

- Гидроксид натрия, химически чистый 1 г.
- Дистиллированная вода 100 мл.

3.4 Гематоксилин Майера неразведенный.

4.0 БЕЗОПАСНОСТЬ: Общие меры предосторожности.

5.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА:

Внешний контроль — срезы ткани с доказанным отложением амилоида.

6.0 ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ:

6.1 Депарафинировать срезы, погрузив в ксилол, 3-4 смены по 2 минуты каждая.

6.2 Промыть в проточной воде.

6.3 Окрасить гематоксилином Майера в течение 4 минут.

6.4 Промыть в проточной воде в течение 2-5 минут.

6.5 Погрузить срезы на 20 минут в следующий раствор (может храниться):

- Насыщенный спиртовой раствор хлорида натрия (см. п. 3.1) 50 мл.

- Гидроксид натрия, 1% раствор (см. п. 3.3) 0,5 мл.

6.6 Перенести срезы в рабочий раствор Конго-красного на 20 минут:

- Насыщенный щелочной спиртовой раствор Конго-красного (см. п. 3.2) 50 мл (NB! Профильтровать непосредственно перед применением!).

- 1% раствор гидроксида натрия (см. п. 3.3) 0,5 мл.

6.7 Обмакнуть дважды в насыщенный спиртовой раствор хлорида натрия (см. п. 3.1).

6.8 Обезводить в абсолютном спирте, 3 смены по 2 минуты каждая.

(NB! Повторное применение абсолютного спирта, использованного ранее при окраске гематоксилином и эозином, приводит к контаминации и ложно-положительному окрашиванию Конго-красным).

6.9 Просветлить в ксилоле, 4 смены чистого ксилола по 2 минуты каждая.

(NB! Более длительное воздействие ксилолом высветляет истинное позитивное окрашивание Конго-красным).

6.10 Заключить срезы, используя покровные стекла и заключающую среду.

7.0 ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ:

- Выявление в ткани почки отложений амилоида любого

происхождения.

Амилоид: розовато-красный при стандартном светооптическом исследовании, яблочно-зеленый при исследовании в поляризованном свете, PAS (+-), серебрение по Джонсу (-), трихром по Массону (-), зеленоватое свечение при исследовании в поляризованном свете.

Ядра – синие.

## **РЕКОМЕНДАЦИИ К ПРОВЕДЕНИЮ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО/ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.**

При выборе метода визуализации иммуноглобулинов (иммунофлюоресценция (ИФ) или иммуногистохимия (ИГХ)) следует учитывать следующие «ЗА» и «ПРОТИВ»:

Имунофлюоресцентная микроскопия (ИФ)

- ЗА: процесс короче по времени.
- ЗА: очень хороший контраст (хороший визуальный сигнал).
- ЗА: проще и надежнее полуколичественная оценка.
- ПРОТИВ: для оптимального результата требуется заморозка (возможно проведение на фиксированных 10% раствором нейтрального забуференого формалина или 4% раствора параформа с предварительной ферментной демаскировкой антигенов).

- ПРОТИВ: фотодеградация флюорохрома.

- ПРОТИВ: требуется специальный флюоресцентный микроскоп.

- ПРОТИВ: малый срок хранения архивного материала.

Имуногистохимия (ИГХ)

- ЗА: для СМ и ИГХ можно использовать один и тот же фиксатор.

- ЗА: просто сопоставить результаты ИГХ-окраски со светооптическими гистологическими структурами в одном и том же блоке.

- ПРОТИВ: более интенсивное фоновое окрашивание.

- ПРОТИВ: не всегда надежное раскрытие и презентирование антигена.

- ПРОТИВ: труднее поликоличественная оценка.

В лаборатории обязательно должны быть использованы для повседневной работы следующие антитела:

- IgG,
- IgA,
- IgM,
- С3с фракция комплимента,



- C1q фракция комплимента,
- легкие цепи иммуноглобулинов kappa,
- легкие цепи иммуноглобулинов lambda,
- фибрин,
- альбумин.

Дополнительно рекомендуется ИФ/ИГХ специальные окраски на выявление следующих протеинов:

- амилоидные белки,
- подклассы IgG,
- цепь Iva молекулы коллагена (COL-IVa),
- цепь III молекулы коллагена (COL-III),
- фибронектин,
- рецептор фосфолипазы A2 (PLA2R),
- миоглобин,
- гемоглобин,
- C4d (для патогистологического исследования трансплантатов),
- вирусы (Polyoma, CMV, EBV, Parvo, Adenovirus, etc.).

## **ПРОТОКОЛЫ ОКРАСОК**

### **1.0 ЦЕЛЬ / ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ:**

Замороженные срезы ткани окрашиваются антителами, конъюгированными с флюоресцеином (FITC), для выявления иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента.

**2.0 ОБРАЗЕЦ:** Замороженные срезы. Если материал биопсии транспортируется в специальных транспортных средах, например Michel's Solution или Zeus Fixative, строго следуйте инструкциям производителя по промывке после транспортного раствора.

### **3.0 ОСНАЩЕНИЕ И РЕАКТИВЫ:**

- 3.1 транспортная среда Michel's.
- 3.2 ОСТ компаунд.
- 3.3 Ацетон.
- 3.4 Глицериновая заключающая среда.

### **4.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ:**

- 4.1 PBS буфер 36,92 г добавить к 4000 мл дистиллированной воды.
- 4.2 Подготовить рекомендованные рабочие разведения флюоресцеин-конъюгированных антител (FITC-антител), см. пункт 7.0 «Контроль качества».

### **5.0 БЕЗОПАСНОСТЬ:**

Если образец ткани для иммунофлюоресцентного исследования доставляется нефиксированным, он является биологически опасным объектом. Применяются общепринятые правила работы со

свежезамороженными (биологически опасными) образцами ткани. При работе на криостате необходимо использовать перчатки. При подозрении на наличие у пациента туберкулеза, ВИЧ-инфекции, вирусного гепатита или другого значимого инфекционного агента следует выбросить нож сразу после резки и провести дезинфекцию криостата.

#### 6.0 ОБОРУДОВАНИЕ, НАСТРОЙКА И ОБСЛУЖИВАНИЕ:

6.1 Криостат требует ежедневной обработки и помывки после использования, калибровка не требуется.

Вакуумная камера не требует чистки и калибровки.

6.2 Влажную камеру ежедневно протирать, при необходимости – теплой проточной водой.

#### 7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА:

В соответствии с международными рекомендациями RPSR (рекомендации Renal Pathology Society) каждое вновь приобретенное антитело требует титрования для определения корректного рабочего разведения или разводиться до рабочего разведения в соответствии с протоколами фирм изготовителей антител.

Позитивный контроль окрашивается новым антителом в трех разведениях (1:4, 1:8, 1:12) и, одновременно, текущим рабочим разведением антитела для сравнения. Как правило, для стандартных антител разведения варьируют от 1:8 до 1:12, иногда достаточным является даже большее разведение.

Результаты иммунофлюоресцентного исследования оцениваются по их корреляции с результатами светооптического и электронно-микроскопического исследований на предмет наличия либо отсутствия депозитов. Множественные срезы для ИФ, как правило, выполняются в режиме последовательных срезов. Техническая адекватность окраски подтверждается путем выявления позитивности в любых срезах для каждого антитела. Внутренние контроли, такие как окрашивание канальцевых цилиндров, сосудов, склерозированных клубочков на иммуноглобулины, легкие цепи и/или комплемент, тоже служат контролем качества. Если ожидаемый результат окрашивания не получен, окраску целесообразно повторить. При возможности можно использовать внешние позитивные контроли.

Существуют тканевые структуры, нормальные и патологические, которые используются в качестве контролей для титрования антител.

#### **Позитивные внутренние контроли:**

IgG – все базальные мембраны у пациентов с сахарным диабетом.

IgA – канальцевые цилиндры.

IgM – участки гломерулосклероза (полного или сегментарного).

Легкие цепи иммуноглобулинов Каппа – канальцевые цилиндры.

Легкие цепи иммуноглобулинов Lambda – канальцевые цилиндры.

Альбумин – все базальные мембраны.

C3 фракция комплимента – стенки артериол, участки гломерулосклероза (полного или сегментарного).

C1q фракция комплимента – участки гломерулосклероза (полного или сегментарного).

Фибриноген – выраженное искусственное фоновое окрашивание.

C4d фракция комплимента – мезангиальное пространство нормальных (не поврежденных) клубочков в трансплантате.

### **Негативный контроль:**

Для каждой нефробиопсии в постановочной панели должен быть срез, не окрашенный первичными антителами; вместо них используется промывочный буфер.

### **ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ КРИОСТАТНОЙ ТКАНИ:**

Образец, залитый в специальной капсуле официальным составом O.C.T Compound (Tissue-Tek), поместить в криостат, расположив капсулу образцом вниз.

1 Как только заливочный состав O.C.T Compound полностью заморожен до твердого вещества с заключенным в него образцом, криостатный блок можно заточить, срезав излишки заливочного состава ножом с прямым лезвием.

2 Поместить криостатный блок в блокодержатель; сделать срезы толщиной 2 микрона, затем распределить их на заряженных гистологических стеклах следующим образом:

1) сначала поместить по одному срезу для каждого антитела на каждом стекле и на одном стекле для окраски гематоксилином и эозином;

2) затем поместить вторые срезы на те же стекла, получив, таким образом, по два разноуровневых среза на каждом стекле. Очертить зону размещения среза с помощью алмазного ножа или специального маркера.

3 Каждое стекло должно быть маркировано – фамилия пациента, номер гистологического исследования и антитело, с которым выполнена окраска.

4 Высушить срезы на воздухе в течение 5-10 минут, затем поместить в ацетон на 5 минут. После этого высушить на воздухе в течение 2 минут.

5 Поместить все стекла в сосуд Коплина соответствующего размера. Промыть в фосфатно-солевом буфере (PBS), три смены по 5 минут.

6 По одному вынуть стекла из сосуда Коплина и стереть избыток буфера PBS с каждого стекла фильтровальной бумагой, не повреждая срезы.

7 Положить все стекла во влажную камеру и нанести антитела

рекомендованного и оттитрованного разведения – по 1-2 капли на срез; красить в течение 30 минут.

8 По окончании окраски вынуть стекла из влажной камеры и поместить снова в сосуд Коплина с буфером PBS.

10 Промыть срезы в буфере PBS, три смены по 5 минут.

11 По одному вынуть стекла из сосуда Коплина и стереть избыток буфера PBS с каждого стекла фильтровальной бумагой, не повреждая срезы.

12 ЗаклЮчить срезы, используя предметные стекла и глицериновую заклЮчающую среду.

### **ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ТКАНИ ФИКСИРОВАННОЙ ФОРМАЛИНОМ С ФЕРМЕНТНОЙ ДЕМАСКИРОВКОЙ АНТИГЕНОВ:**

1 Поместить парафиновый блок в блокодержатель; сделать срезы толщиной 2 микрона, затем распределить их на заряженных гистологических стеклах следующим образом:

1) сначала поместить по одному срезу для каждого антитела на каждом стекле и на одном стекле для окраски гематоксилином и эозином;

2) затем поместить вторые срезы на те же стекла, получив, таким образом, по два разноуровневых среза на каждом стекле. Очертить зону размещения среза с помощью алмазного ножа или специального маркера.

2 Каждое стекло должно быть маркировано – фамилия пациента, номер гистологического исследования и антитела, с которым выполнена окраска.

3 Высушить срезы на воздухе в течение 5-10 минут.

4 Поместить все стекла в сосуд Коплина соответствующего размера. Промыть в фосфатно-солевом буфере (PBS), три смены по 5 минут.

5 По одному вынуть стекла из сосуда Коплина и стереть избыток буфера PBS с каждого стекла фильтровальной бумагой, не повреждая срезы.

6. Положить все стекла во влажную камеру и нанести раствор фермента (разведенный в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя) – по 1-2 капли на срез; поместить в термостат при температуре 37°C на 60 минут.

7. По окончании инкубации для остановки ферментативной реакции поместить все стекла в сосуд Коплина соответствующего размера в ТРИС-буферный раствор при температуре +8°C на 60 минут (холодильник).

8 Извлечь все стекла из холодильника, убрать избытки буферного раствора и во влажной камере нанести антитела рекомендованного и оттитрованного разведения – по 1-2 капли на срез; красить в течение 30 минут.

9 По окончании окраски вынуть стекла из влажной камеры и поместить снова в сосуд Коплина с буфером PBS.

10 Промыть срезы в буфере PBS, три смены по 5 минут.

11 По одному вынуть стекла из сосуда Коплина и стереть избыток буфера PBS с каждого стекла фильтровальной бумагой, не повреждая срезы.

12 ЗаклЮчить срезы, используя предметные стекла и глицериновую заклЮчающую среду (не флюоресцирующую).

### ***ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.***

Интерпретация результатов осуществляется по критериям, описанным в таблице 2 в соответствии с алгоритмом оценки (таб. 3).





## **РЕКОМЕНДАЦИИ К ПРОВЕДЕНИЮ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ (ЭМ).**

Трансмиссионная электронная микроскопия (ЭМ) - ценный метод в исследовании нефробиопсий. По данным литературных источников (Naas M. J Am Soc Nephrol 8:70, 1997) примерно в половине случаев ЭМ была решающей либо очень важной для формулировки клинического диагноза:

- Решающее значение в 21% случаев.
- Важной для диагноза в 21 % случаев.
- Не требовалась для уточнения диагноза в 58% случаев.

### **СОРТИРОВКА И ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА НЕФРОБИОПСИИ.**

1.0 ЦЕЛЬЮ сортировки материала является разделение образца ткани почки так, чтобы для каждого метода исследования (световая микроскопия; иммунофлюоресцентная микроскопия и электронная микроскопия) был представлен корковый слой с клубочками для оптимального оценки патологических процессов.

2.0 ОБРАЗЦЫ: полученный материал ткани почки необходимо разделить на три фрагмента: для СМ – поместить в 4% параформальдегид (или 10% нейтральный буферный формалин), для ИФ – сразу глубоко заморозить или поместить в транспортную среду Мишеля (Michel's) ПРИМЕЧАНИЕ: в силу особенностей Волгоградской области – территориальная удаленность лабораторий допустимым является фиксация материала нефробиопсии в 4% растворе параформальдегида или в 10% растворе нейтрального буферного формалина, для ЭМ – поместить в 2% глутаровый альдегид.

3.0 РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ / РЕАГЕНТЫ: Все реагенты хранятся в соответствии с инструкциями производителя.

- 3.1 Диссекционный микроскоп/увеличительные лупы x15, x20.
- 3.2 Фосфатный буфер (PBS).
- 3.3 Лезвия.
- 3.4 Чашка Петри (Petrie).
- 3.5 Фильтровальная бумага.
- 3.6 Параформальдегид 4%.
- 3.7 Глутаровый альдегид 2%.
- 3.8 Транспортная среда Мишеля (Michel's).
- 3.9 Перчатки.
- 3.10 Стерильные деревянные палочки-аппликаторы.

4.0 БЕЗОПАСНОСТЬ: Общие меры предосторожности. Выполняется распределение фрагментов свежей ткани, поэтому применяются стандартные меры биологической безопасности.



5.0 **ОБОРУДОВАНИЕ, НАСТРОЙКА И ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:** Диссекционный микроскоп всегда должен содержаться в чистоте и хорошем рабочем состоянии.

6.0 **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА:** Оценить правильность деления полученного материала ткани почки по наличию клубочков в каждом из трех фрагментов (СМ, ИФ, ЭМ).

7.0 **ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ:**

7.1 Перенести столбик ткани из биопсийной иглы на фильтровальную бумагу в чашку Петри, используя стерильную палочку-аппликатор.

7.2 Сразу нанести PBS на столбик ткани во избежание высыхания материала.

7.3 С помощью диссекционного микроскопа оценить ткань на наличие клубочков (на изображении ниже они очерчены окружностями).

7.4 **Примечание:**

- Если нет диссекционного микроскопа, можно использовать ручную лупу (визуализации приближительная).

- Если ткань с выраженной ишемией или склерозирована, то клубочки визуализируются с трудом. В сохранной ткани под диссекционным микроскопом они видны как маленькие красноватые округлые участки.

7.4 Когда получено достаточно материала с адекватным количеством клубочков (обычно требуется 2 столбика ткани), для деления на фрагменты используется тонкое лезвие.

7.5 Цель – выделить небольшие порции коркового слоя для ЭМ (как минимум, 1-2 клубочка) и для ИФ (как минимум, 3-4 клубочка), остальное – для СМ. Это выполняется следующим образом:

7.6 Если ткани достаточно, отсечь фрагменты по 1-2 мм для ЭМ с обоих концов каждого тканевого столбика и поместить их в глутаровый альдегид.

7.7 Отсечь фрагменты по 3-4 мм для ИФ и поместить их в транспортный раствор Мишеля (Michel's) или 10% формалин/4% параформальдегид.

7.8 Оставшийся материал поместить в параформальдегид для СМ.

**Примечание:** Если получен скудный материал, то делить его следует в соответствии с клиническими данными и после консультирования с нефропатологом и нефрологом – какие методы исследования, наиболее вероятно, будут ключевыми для диагноза. Например, ИФ и СМ определяющие при IgA-нефропатии. ЭМ и ИФ являются ключевыми для синдрома Альпорта и тонких базальных мембран.

7.9 Промаркировать пробирки, указав фамилию, инициалы и возраст пациента, а также указав, нативная это почка или трансплантированная, поскольку перечень обязательных окрасок для них отличается.

## **ПРОТОКОЛ ОКРАСКИ**

### **1.0 ЦЕЛЬ / ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ:**

Трансмиссионная электронная микроскопия выявляет ультраструктурные признаки, необходимые для верификации и постановки точного диагноза, или подтверждает находки светооптического и иммунофлюоресцентного исследований.

### **2.0 ОБРАЗЕЦ:**

В повседневной практике это фрагмент ткани почки в поперечно связывающем фиксаторе (2,5% глутаровый альдегид). Альтернативой являются:

1) фрагмент ткани почки после гистологической проводки для световой микроскопии и заливки в парафин может быть извлечен из парафинового блока и подготовлен для выполнения электронно-микроскопического исследования;

2) свежемороженый для иммунофлюоресценции фрагмент ткани почки может быть извлечен, зафиксирован и подготовлен для электронной микроскопии.

### **3.0 ОСНАЩЕНИЕ И РЕАКТИВЫ:**

- Глутаровый альдегид 2,5%.
- Тетроксид осмия 1%.
- Эпоксидная смола Ерон.
- Оксид пропилена.
- Ксилол.
- Заливочные капсулы (ВЕЕМ(R)).
- Буфер PBS 0,01M.
- Уранил-ацетат.
- Цитрат свинца.
- Ледяная уксусная кислота.
- Фильтрованная деионизированная вода.

### **4.0 ПРОБОПОДГОТОВКА:**

4.1 Поместить тканевой фрагмент в капле буфера PBS 0,01M в пластмассовую ванночку. С помощью диссекционного микроскопа найти подходящие для исследования участки. Нарезать ткань на кубики (с длиной грани примерно 1 мм) – до 10 блоков на один случай.

4.2 Из светооптического образца, фиксированного в формалине и залитого в парафин, с помощью лезвия извлечь подходящий для ЭМ участок после просмотра светооптических окрасок и сравнения их с тканью в парафиновом блоке. Поместить выделенный фрагмент в маркированную пластиковую микропробирку. Депарафинировать ткань в ксилоле, три смены по 10 минут каждая (или дольше при необходимости). Более крупные фрагменты ткани могут потребовать депарафинизации в

течение 12-18 часов. Обезводить следующим образом: 100% спирт, 2 смены по 10 минут; затем по 10 минут: 95% спирт, 75% спирт, 30% спирт, PBS (или вода). После этого – см. п. 4.1.

4.3 Из свежемороженой ткани, использовавшейся для иммуофлюоресценции, удалить ОСТ вокруг ткани с помощью скальпеля или лезвия. Поместить фрагмент ткани в буферный 2,5% глутаровый альдегид (минимум на 1 час); после этого – см. п. 4.1.

## 5.0 ОБЕЗВОЖИВАНИЕ И ЗАЛИВКА В ЭПОКСИДНУЮ СМОЛУ EPON

5.1 Выполнить следующую последовательность:

1. PBS 0,01M или дистиллированная вода 1 минута.
2. Тетроксид осмия\* 1% 30 минут.
3. Спирт 30% 5 минут.
4. Спирт 30% 5 минут.
5. Спирт 50% 5 минут.
6. Спирт 75% 5 минут.
7. Спирт 100% 5 минут.
8. Спирт 100% 5 минут.
9. Оксид пропилена\* 5 минут.
10. Оксид пропилена\* 5 минут.
11. Оксид пропилена / Епон\* (1:1) 20 минут.
12. Епон\* 100% 30 минут.

\* **Примечание:** Эти компоненты являются сильными окислителями и токсическими тяжелыми металлами. Пары тетроксид осмия, в первую очередь, повреждают мембраны слизистой оболочки дыхательных путей и роговицу. **ПРИ РАБОТЕ С ЭТИМИ РЕАКТИВАМИ ВСЕГДА ИСПОЛЬЗОВАТЬ ВЫТЯЖНОЙ ШКАФ ИЛИ ОБЕСПЕЧИТЬ ДОСТАТОЧНУЮ БЕЗОПАСНУЮ ВЕНТИЛЯЦИЮ ГИСТОПРОЦЕССОРА.** Использовать спецодежду, перчатки, защитные очки.

5.2 Заливка: Подготовить 10 заливочных капсул ВЕЕМ® для каждого случая. Вложить соответствующую маркировочную бирку в каждую капсулу (общий номер исследования и дополнительная внутренняя маркировка, если она выполнена). Залить капсулу наполовину эпоксидной смолой Епон. Использовать пинцет для погружения фрагментов ткани в капсулы.

5.3 Поместить в термостат 65<sup>0</sup> С на ночь.

## 6.0 УЛЬТРАМИКРОТОМИЯ

6.1 Выполнить толстые эпоксидные срезы (1-2 микрона), для того чтобы локализовать клубочки и другие структуры, требующие дальнейшей оценки.

6.2 Заточить блоки, включающие необходимые участки, сделать

тонкие эпоксидные срезы (60-80-100 нм)

## 7.0 ОКРАШИВАНИЕ ТОЛСТЫХ СРЕЗОВ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

7.1 Основные положения: Толстые пластиковые срезы (1-2 микрона), помещенные в капле воды на предметное стекло, покрытое аminosиланом или полилизинном, и высушенные на горячей плитке, окрашиваются 1% раствором толуидинового синего.

7.2 Реактивы:

- Толуидиновый синий «О».
- Борат натрия.
- DPX заключающая среда.

7.3 Приготовление красителя – 1% толуидиновый синий «О» в 1% борате натрия: Растворить 5 г бората натрия в 500 мл толуидинового синего 1%. Профильтровать в чашку Коплина.

7.4 Процедура окраски:

1. Высушить срезы, размещенные на стекле, на горячей плитке (70-90<sup>0</sup>С).
2. Наполнить шприц объемом 10 мл (с присоединенным фильтром) 1% раствором толуидинового синего.
3. Покрыть срезы фильтрованным толуидиновым синим; продолжать нагревание в течение 1 минуты.
4. Сполоснуть водой.
5. Высушить на воздухе.
6. Заклчить срезы, используя покровные стекла и заключающую среду.

## 8.0 ОКРАШИВАНИЕ ТОНКИХ СРЕЗОВ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

8.1 Основные положения: Тонкие срезы ( $\approx 100$  нм) окрашиваются уранил-ацетатом и цитратом свинца для достижения различной электронной плотности структур, подлежащих оценке.

8.2 Материалы:

- Уранил-ацетат.
- Цитрат свинца.
- Ледяная уксусная кислота.
- Гидроксид натрия (NaOH), химически чистый.
- Фильтровальная бумага 70 мм.
- Фильтрованная деионизированная вода.
- Медные сетки для ЭМ.

8.3 Приготовление красителя – 5% уранил-ацетат:  
Смешать:

1. Уранил-ацетат 2 г.
2. Деионизированная вода 40 мл.
3. Ледяная уксусная кислота 4 капли.
4. Хорошо перемешать в полиэтиленовой тубе (сосуде) объемом 50 л, избегая яркого света. Распределить по 1,5 мл в микроцентрифужные пробирки (по 1,7 мл). Хранить в закрытом шкафу.

#### 8.4 Приготовление красителя – цитрат свинца:

Смешать:

1. Деионизированная вода 50 мл.
2. Гидроксид натрия (NaOH), химически чистый 0,2 г.
3. Цитрат свинца 0,2 г.

Растворить кристаллы NaOH в 50 мл деионизированной воды в полиэтиленовой пробирке объемом 50 мл. Добавить цитрат свинца. Перемешать. Распределить по 1,5 мл в пробирки для микроцентрифуги (по 1,7 мл). Хранить в закрытом шкафу.

#### 8.5 Методика окраски:

1. Перед изготовлением ультратонких срезов поместите 1-2 пузырька с медными сетками в мензурку с 100% спиртом, так чтобы спирт покрывал их полностью. Повращать и слить спирт. Повторить весь процесс три раза. Положить фильтровальную бумагу на дно чашки Петри и, перевернув, накрыть ею мензурку. Затем перевернуть накрытую чашкой Петри мензурку, так чтобы сетки упали на фильтровальную бумагу. Высушить их в чашке Петри в духовом шкафу.

2. Повернуть все сетки матовой стороной вверх. Нанести на каждую сетку адгезивный слой с помощью специального карандаша, приложив его однократно к матовой стороне каждой сетки. Высушить при комнатной температуре 1-2 минуты.

3. Выдержать в термостате 60<sup>0</sup>С не менее 30 минут или высушить на воздухе 30 минут, затем поместить в термостат на 5-10 минут.

4. Центрифугировать пробирки с цитратом свинца (см. п. 8.4) и 5% уранил-ацетатом (см. п. 8.3) в микроцентрифуге в высокоскоростном режиме 14 x 1000 (т.е. роторный радиус 14 см; скорость вращения 1000 оборотов в минуту) в течение 4-6 минут. Наполнить 15 боросиликатных пробирок фильтрованной деионизированной водой.

5. Обработать специальную синаптическую панель адгезивом. Расположить синаптическую панель желобовидной насечкой вверх и поместить на нее медные сетки матовой стороной вверх для дальнейшей окраски. Убедиться, что сетки прочно укреплены на панели.

6. Пипеткой-переноской осторожно втянуть цитрат свинца из пробирки, стараясь не засосать полученный после центрифугирования осадок. Заткнуть конец пипетки гемостатической губкой, поставить ее вертикально. Срезать пипетку непосредственно над уровнем цитрата свинца. Затем отрезать «грушу» пипетки посередине – она будет служить

крышкой для пипетки в процессе окраски. Поместить синаптическую панель с закрепленными на ней медными сетками в цитрат свинца – красить в течение 30 секунд. Сполоснуть медные сетки 5 раз в фильтрованной деионизированной воде в боросиликатной пробирке (см. выше).

7. Повторить вышеописанную последовательность с 5% уранил-ацетатом; красить в течение 6 минут.

8. Повторить снова процесс с цитратом свинца.

9. Осторожно снять медные сетки с панели. Промокнуть их на фильтровальной бумаге и поместить в чашку Петри с соответствующим номером исследования.

Примечание: Красители, как правило, пригодны в течение 4 недель. При обнаружении в ходе ультраструктурного исследования осадка в ткани красители следует выбросить.

Деионизированную воду можно вскипятить и профильтровать для использования во всех растворах. Для получения наилучшего результата перед этапом заливки требуется качественная фиксация в осмии с целью двойного контрастирования. Удлинение времени окраски не улучшает контрастность срезов, если они выполнены из плохо подготовленного блока.

## **АЛГОРИТМ КОМПЛЕКСНОЙ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ НЕФРОБИОПСИИ.**

Производится оценка и описание следующих критериев:

### **1. Клубочки.**

- Количество клубочков в биоптате
- Количество полностью склерозированных клубочков
- Наличие полулуний, стадия их эволюции
- Размеры клубочков
- Степень клеточности, ее локализация, состав клеток
- Состояние висцерального (подоцитов) и париетального эпителия
- Количество мезангиального матрикса
- Гломерулярная базальная мембрана (ГБМ) - толщина, структура, целостность, многоконтурность.
- Периферическая миграция и интерпозиция мезангия
- Белковые депозиты, их локализация
- Просветы капиллярных петель (клетки, тромбы, инсудат, коллапс)
- Сегментарный склероз (стадия и морфологический вариант)
- Капсула Боумана (толщина, целостность, многоконтурность)

### **2. Канальцы.**

- Тубулярная базальная мембрана (ТБМ) - толщина, структура, целостность, многоконтурность, сморщивание, белковые депозиты и др.
- Сохранность щеточной каймы эпителия проксимальных извитых канальцев
- Цитоплазма эпителия канальцев (зернистость, вакуолизация, белковые капли, кристаллы)
- Ядра эпителия канальцев (гиперхромия, полиморфизм, специфические вирусные изменения)
- Просветы канальцев (непатологический белок Tamm-Horsfall, патологический белок, эритроциты, кристаллы, белок Bence Jones)

### 3. Сосуды.

- Толщина стенки артерий
- Толщина стенки артериол
- Гипертрофия мышечного слоя стенки
- Фиброз интимы
- Склероз медиальной оболочки
- Инсудация («гиалиноз»)
- Белковые депозиты
- Клеточная инфильтрация стенки (состав инфильтрата, гранулемы)
- Фибриноидный некроз стенки
- Тромбоз (степень давности)

### 4. Интерстиций.

- Отек
- Фиброз
- Склероз
- Белковые депозиты
- Кристаллы
- Клеточная инфильтрация (клеточный состав, гранулемы).

Результаты исследования оформляются в виде протокола/заключения.