

# Оглавление

---

<b>Предисловие редактора серии</b> .....	18
Сокращения .....	20
<b>Введение</b> .....	21

## Часть I. ОБЪЕКТ

<b>Глава 1. Общие сведения</b> .....	27
Литература .....	32
<b>Глава 2. Контроль и оценка качества</b> .....	33
Качество .....	33
Контроль качества .....	34
Оценка качества .....	34
Сравнительные характеристики контроля и оценки качества .....	35
Можно ли отнести 10%-й случайный пересмотр препаратов с отрицательными результатами Пап-теста к контролю качества? .....	35
Системное управление качеством .....	36
Анализ контроля и оценки качества .....	36
Литература .....	38
<b>Глава 3. Сбор образцов</b> .....	39
Негинекологические образцы .....	39
Свежие образцы выпотных жидкостей: подвергать их свертыванию или нет? .....	41
Гинекологические образцы .....	42
Предыстория .....	43
Традиционный Пап-тест .....	43
Жидкостный метод приготовления препаратов .....	44
Литература .....	49
<b>Глава 4. Солевые растворы</b> .....	52
Основные исторические вехи .....	52
Физиологический раствор .....	52
Сбалансированные электролитные растворы .....	55
Сбалансированные солевые растворы .....	56
Изотоничность и осмолярность .....	56
Литература .....	57
<b>Глава 5. Приготовление препаратов</b> .....	59
Основные исторические вехи .....	59
Предыстория .....	60

Сравнение гинекологических образцов с негинекологическими ...	60
Приготовление препаратов.....	60
Контроль и оценка качества .....	63
Традиционный («прямой») мазок .....	66
«Помощники» адгезии .....	67
Альбуминизированные стекла.....	68
Матированные стекла.....	68
Заряженные стекла.....	69
Почему клетки не прилипают к стеклу .....	70
Как сделать стекла смачиваемыми.....	70
Мазки, полученные из материала тонкоигольной аспирационной биопсии.....	72
Калибр тонких игл.....	74
Приготовление препаратов из негинекологических образцов ручным жидкостным методом .....	75
Метод гомогенизации мокроты Саккоманно .....	75
Материалы, необходимые для выполнения методики Саккоманно.....	76
Модифицированный метод Саккоманно .....	76
Приготовление препаратов из гинекологических образцов ручным жидкостным методом.....	77
Автоматизированное жидкостное приготовление препаратов.....	77
Заключение.....	80
Приложение А. Применение сапонина для кровянистых клеточных суспензий .....	80
А1. Материалы.....	81
А2. Методика .....	81
А3. Результаты.....	82
А4. Обсуждение .....	82
Литература.....	82
<b>Глава 6. Цитоцентрифугирование .....</b>	<b>86</b>
Основные исторические вехи.....	86
Оценка объема образца.....	88
Не помещайте в камеру цитоцентрифуги образец, превосходящий ее по объему.....	90
Удержание клеток на стеклах .....	92
Заключение.....	93
Литература.....	93
<b>Глава 7. Мембранная фильтрация .....</b>	<b>95</b>
Основные исторические вехи.....	95
Материалы и методы.....	96
Материалы .....	97

Методы (проводятся в боксе биологической безопасности).....	97
Результаты .....	100
Обсуждение .....	100
Литература.....	102
<b>Глава 8. Фиксация .....</b>	<b>103</b>
Основные исторические вехи .....	103
Иерархия материалов и методов фиксации .....	106
Заменители спирта .....	106
Высушивание защищенных фиксированных клеток на воздухе.....	107
Высушивание и регидратация незащищенных клеток .....	108
Консервация биоматериала.....	109
Собираем все детали воедино.....	110
Состав внутриклеточной жидкости.....	111
Расположение законсервированных и фиксированных клеток.....	113
Длина углеродной цепи спирта.....	115
Концентрация спирта.....	115
Сохранять ли препарат влажным или позволить ему высохнуть? .....	116
Расположение клеток при высушивании на воздухе .....	116
Используется ли Карбовакс при высушивании препарата на воздухе?.....	118
Гинекологические образцы и материал ТАБ .....	119
Негинекологические образцы.....	119
Общие наблюдения и обсуждение.....	120
Заключение .....	122
Литература.....	124
<b>Глава 9. Приготовление клеточных блоков.....</b>	<b>127</b>
Основные исторические вехи .....	127
Методика с использованием тромбинового сгустка.....	128
Материалы .....	129
Методы .....	129
Альтернативные методы приготовления клеточного блока.....	130
Увеличение количества клеток в блоке .....	132
Улучшение качества приготовления препарата.....	133
Улучшение консистенции.....	133
Клеточные блоки и иммуногистохимия.....	133
Обсуждение .....	134
Литература.....	135
<b>Глава 10. Окраска по Папаниколау.....</b>	<b>137</b>
Основные исторические вехи .....	137

Материалы и методы .....	141
Гематоксилин Гилла.....	142
OG, модифицированный Гиллом .....	142
EA, модифицированный Гиллом .....	144
Заменитель водопроводной воды Скотта.....	145
Особые указания .....	146
Результаты.....	151
Обсуждение .....	152
Гематоксилин.....	152
Дифференцировка при окрашивании гематоксилином.....	153
Отсинивание гематоксилина .....	154
Оранжевый Ж.....	154
EA.....	155
Промывка.....	159
STAT-Par: экспресс-окрашивание по Папаниколау.....	161
Материалы .....	161
Методы .....	162
Особые указания .....	162
Оценка качества с использованием буккальных мазков .....	163
Удаление красителя .....	167
Устранение ошибок .....	168
Литература.....	174
<b>Глава 11. Контроль перекрестного загрязнения .....</b>	<b>176</b>
Основные исторические вехи .....	176
Папаниколау о перекрестном загрязнении.....	177
CLIA '88 § 493.1274 «Стандарт: цитология» .....	178
Почему в CLIA '88 было обращено внимание на перекрестное загрязнение?.....	178
Материалы .....	181
Методы .....	183
Обсуждение .....	184
Флотирующие клетки действительно могут присутствовать .....	185
Заключение и рекомендации.....	188
Не делайте лишней работы.....	188
Необходимо делать только то, что нужно .....	188
Литература.....	189
<b>Глава 12. Окраска гематоксилином и эозином .....</b>	<b>191</b>
Основные исторические вехи .....	191
Гематоксилин .....	192
Эозин .....	192
Особые указания .....	195
Результаты.....	198

Заключение.....	198
Литература.....	199
<b>Глава 13. Окраска по Романовскому .....</b>	<b>200</b>
Основные исторические вехи .....	200
Преимущества окраски по Романовскому в рутинной клинической практике .....	202
Литература.....	208
<b>Глава 14. Специальные красители и методы окрашивания.....</b>	<b>209</b>
Классификация биологических красителей FDA и сертификация специальных красителей BSC .....	209
Специальные красители и окраски.....	214
Специальное окрашивание: ручные или автоматизированные протоколы.....	222
Заключение.....	223
Литература.....	223
Дополнительная литература.....	224

## Часть II. ИЗОБРАЖЕНИЕ

<b>Глава 15. Просветление.....</b>	<b>227</b>
Основные исторические вехи .....	227
Альтернативы ксилолу.....	228
Ксилол.....	229
«Вечный» ксилол.....	230
Литература.....	234
<b>Глава 16. Заключающие среды .....</b>	<b>236</b>
Основные исторические вехи .....	236
Источник и вид смолы: химический синтез, искусственная смола.....	240
Растворимость в ароматических углеводородах и концентрация, необходимая для достижения вязкости, соответствующей вязкости 60% (масса/объем) раствора канадского бальзама в ксилоле.....	242
Растворы: тип растворителя, массовое соотношение растворителя и смолы .....	242
Скорость высыхания раствора: высокая, средняя, низкая (с указанием временных интервалов).....	243
Устойчивость к аспирации воздуха.....	244
Показатель преломления заключающих растворов и твердой смолы с точностью до 3 знаков после запятой.....	245
Заключение.....	250
Литература.....	250

<b>Глава 17. Покровные стекла</b> .....	252
Основные исторические вехи.....	252
Технические характеристики стандартного покровного стекла для микроскопии Королевского микроскопического общества .....	253
Стандартная спецификация E211 Американского общества по испытаниям и материалам.....	254
Устойчивость объективов к изменению толщины стандартного покровного стекла 0,17 мм.....	255
Влияние числовой апертуры на качество изображения.....	258
Толщина слоя заключающей среды.....	259
Единые цены.....	260
Размеры покровного стекла.....	261
Заключение.....	262
Литература.....	263
<b>Глава 18. Заключение в среду</b> .....	265
Основные исторические вехи.....	265
Нанесение покровных стекол на фильтры Millipore.....	266
Материалы для разделения 47-мм фильтров Millipore пополам.....	266
Методика.....	267
Результаты.....	269
Обсуждение.....	269
Коричневый артефакт (или «кукурузные хлопья»).....	269
Толщина слоя заключающей среды.....	273
Потеря массы при испарении растворителя из заключающей среды.....	273
Метод «готовки» препаратов уменьшает толщину слоя заключающей среды и ускоряет его затвердевание.....	274
Литература.....	276
<b>Глава 19. Освещение по Келеру</b> .....	277
Очистка микроскопа.....	280
Что делать: советы.....	281
Что делать: техника очистки микроскопа.....	282
Окуляры.....	282
Верхняя линза конденсора.....	282
Объективы.....	282
Что делать: сроки очистки микроскопа.....	283
Ежедневно.....	283
Еженедельно.....	283
По мере необходимости.....	283
Что не делать.....	283
Практическая микроскопия (или «За работу, товарищи!»).....	284

Рабочее освещение по Келеру .....	284
«Световое представление» .....	284
Чистота идет рука об руку с качеством .....	284
Толщина препарата .....	285
Коррекция числовой апертуры восстанавливает качество изображения .....	285
Глубина резкости и фокусировки .....	286
Увеличение и укрупнение: показатель «X» .....	287
Фотомикрография и микрофотография .....	287
Глоток свежего воздуха .....	287
Литература .....	288

### Часть III. ПРОЧЕЕ

<b>Глава 20. Просмотр цитологических препаратов .....</b>	<b>291</b>
SPADE — протокол просмотра препаратов в целях повышения диагностической эффективности .....	295
Предварительный просмотр .....	295
Исследование .....	297
Проверка .....	298
Объектив 4x .....	298
Маркировка чернильными точками .....	300
Перекрытие, выраженное в процентах .....	300
Просмотр препаратов с применением шаблона Гилла .....	304
Величина поля зрения окуляра .....	306
Зона видимости .....	308
Внимание и снижение внимания .....	309
Процесс просмотра препаратов: поиск и внимание, неправильное толкование и недооценка .....	312
Заключение .....	316
Литература .....	317
<b>Глава 21. Классификация Бетесда-2001, CLIA '88 и анализ данных .....</b>	<b>320</b>
Основные исторические вехи .....	320
Клеточная адекватность .....	326
Определение процесса просмотра цитологических препаратов и отведенного на него времени .....	327
Расчет рабочей нагрузки .....	328
Как лаборант может рассчитать рабочую нагрузку полуавтоматических средств цитологического наблюдения, утвержденных FDA для использования в гинекологии .....	329
Актуальные проблемы учета рабочей нагрузки и определения ее максимальных пределов .....	329

Как лаборант может рассчитать рабочую нагрузку полуавтоматических средств цитологического наблюдения, утвержденных FDA? .....	329
Пределы рабочей нагрузки.....	330
Сравнение ошибок одного цитотехнолога, выявленных при повторном просмотре, с результатами всей лаборатории.....	331
Доля ложноотрицательных результатов.....	331
Вычисление доли ДЛО (расчетной).....	334
Ускоренная проверка 100 % результатов и замедленная проверка 10 % результатов (т. е. проверка 10 % результатов по материалам CLIA '88).....	337
Заключение.....	337
Литература.....	338
<b>Приложение А. Примечания к терминологии.....</b>	<b>341</b>
Литература.....	344
<b>Приложение В. Арифметика в цитологических лабораториях.....</b>	<b>345</b>
Процентная концентрация.....	346
Наиболее распространенные примеры выражения относительной концентрации .....	346
Спирты.....	347
Биологические красители.....	347
Молярность (молярная концентрация).....	348
Нормальность раствора.....	348
Замечания по безопасности при обращении с кислотой.....	349
Перевод единиц температуры.....	350
Центробежная сила .....	350
Формальдегид vs формалин .....	352
<b>Приложение С. Стандарты безопасности.....</b>	<b>353</b>
Основные исторические вехи .....	353
Литература.....	354
<b>Приложение D. Метод переноса клеточного материала.....</b>	<b>355</b>
Цель и функция .....	355
Материалы.....	355
Метод.....	355
Литература.....	357
<b>Приложение Е. Информация для заказа.....</b>	<b>358</b>
<b>Приложение F. Использование термина «хроматин» .....</b>	<b>360</b>
Литература.....	361
<b>Приложение G. Полезные URL-адреса.....</b>	<b>362</b>



<b>Приложение Н. Избранные исторические вехи в развитии микротехники</b> .....	366
Литература.....	368
<b>Приложение I. Просмотр цитологических препаратов и CPR</b> .....	369
Литература.....	372
<b>Приложение J. Награды и публикации автора</b> .....	373
Примечания.....	373
Награды и премии.....	373
Публикации (269).....	373
Монографии.....	374
Главы из монографий.....	374
Рецензирование статей.....	375
Рефераты.....	377
Статьи.....	378
Письма редактору.....	382
Печатные материалы поставщиков оборудования.....	383

# Глава 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

---

*Я мыслю, следовательно, я существую.*

Рене Декарт

Приготовление цитологических препаратов — это наука об оптимизации и стандартизации сбора и подготовки цитологических образцов с целью их дальнейшего изучения, выявления интересующих нас клеток и точной интерпретации морфологии ядер. Приготовление цитологических препаратов базируется на одном всеобъемлющем принципе: когда мы готовим препараты для цитологической диагностики, мы должны пытаться понимать, что мы делаем и почему. В противном случае мы будем исследовать клеточный материал, обработанный непонятным образом, что может снизить его диагностическую значимость. По аналогии с известной книгой Странка и Уайта «Пусть говорит каждое слово» в контексте приготовления цитологических препаратов мы можем обозначить нашу цель так: «Пусть говорит каждая клетка».

Настоящая книга разделена на три больших части:

1. Объект.
2. Изображение.
3. Прочее.

В разделе «Объект» рассматриваются материалы и методы, применяемые в работе с образцами, включая сбор биоматериала и его окраску. К разделу «Изображение» относятся материалы и методы, влияющие на формирование визуальных характеристик препарата: просветляющая жидкость, среда для заключения, покровное стекло, осветитель микроскопа. Практически необходимо учитывать, что мы смотрим на изображение клеток, а не на сами клетки. Если мы будем иметь представление о качественных препаратах, мы сможем распознать некачественные, узнать причину ошибки и устранить ее. Раздел «Прочее» включает то, как мы идентифицируем клетки с признаками атипии в процессе просмотра препаратов, и наши дальнейшие действия, направленные на эффективность цитологического скрининга и управление рисками лаборатории из-за получения ложноотрицательных результатов.

Принципы, лежащие в основе приготовления препаратов, основаны на законах биологии, химии, физики и оптики. Эти принципы, охватывающие все этапы, включая сбор образцов и микроскопию препаратов, описаны ниже.

1. Свежие образцы облегчают обработку препарата и уплотнение клеток.
2. Добивайтесь соответствия характеристик приготовленного препарата исходному образцу.
3. Для улучшения визуализации хроматина добивайтесь уплотнения клеток.
4. Фиксируйте препараты немедленно для сохранения морфологии клеток.
5. Для наилучшей визуализации и интерпретации клеток выбирайте оптимальный способ окраски.
6. Используйте заключающие среды для максимально эффективно использования оптических характеристик микроскопа.
7. Для достижения максимальной разрешающей способности настраивайте микроскоп по Келеру и поддерживайте его оптику в чистоте.
8. Для наилучшей выявляемости клеток с признаками атипии выберите оптимальный метод просмотра препарата.

Все материалы и методы, применяемые для приготовления цитологических препаратов (от сбора материала до микроскопии), вносят свой вклад в получаемый результат. Иными словами, они определяют качество и количество доступных для просмотра клеток, оказывая непосредственное влияние на характеристики препарата: его размер, клеточность, толщину, биохимический состав, чувствительность к красителям, оптическую плотность, цвет и текстуру мазка, коэффициент преломления, преломление и разрешающую способность микроскопа.

Качество препаратов оценивается в лаборатории при цитологическом исследовании, от которого соответственно зависит и качество результатов анализов. Препараты неудовлетворительного качества создают трудности в интерпретации даже у самых опытных морфологов (рис. 1.1, см. цветную вклейку).

Результаты анализов Пап-теста по малоинформативным препаратам могут создать ложное впечатление о низкой чувствительности скринингового метода в лаборатории, и вклад ложноотрицательных результатов может быть недооценен. Цель настоящего издания — попытаться применить объективные стандарты на принципиально субъективные процессы для повышения эффективности работы цитологических лабораторий.

В этой книге рассматриваются основы приготовления цитологических препаратов, включая микроскопию, скрининг и анализ данных. Она предназначена прежде всего для практического использования. Тем не менее дано не только феноменологическое описание основных ма-

териалов и методов, применяемых в приготовлении гинекологических и негинекологических образцов, препаратов ТАБ (тонкоигольной аспирационной биопсии), но и принципы, лежащие в их основе.

Книга задумывалась не как энциклопедия, она не даст читателю ответы на все вопросы. Не все опубликованное стоит читать или заслуживает упоминания и цитирования. Все, что обсуждается здесь, действительно имеет значение. Никаких абстракций. Качественная подготовка препаратов должна контролировать всевозможные клеточные артефакты. Мое намерение — дать информацию, которая обеспечит возможность и вдохновит читателей оценить и улучшить технику подготовки цитологических препаратов в лаборатории, которую они используют с подавляющим большинством образцов.

В издание вошло многое, но не все, что я публиковал раньше и что нелегко найти. В приложении J внимательный читатель распознает значительную часть материалов, которая издавалась в большем объеме.<sup>2</sup> Я попытался включить в сравнительно небольшую книгу те вопросы, которые, как я определил для себя, дают качественные результаты.

Книга адресована прежде всего всем тем, кто связан прямо или косвенно с приготовлением цитологических препаратов, она будет полезна каждому, кто готовит цитологические и гистологические препараты любого назначения. Все микроскопические препараты скорее сходны, чем различны, т. е. они должны быть полезными по их прямому назначению — вот рабочее определение качества.

Как выбрать оптимальную тактику и каких результатов ожидать, если вы никогда раньше не занимались микроскопией биологических образцов? В конце концов, количество способов приготовить плохой препарат гораздо больше, чем приготовить хороший. Использование огромного числа нестандартных методик, скорее всего, приведет к плохому результату. Из множества методов эта книга призвана направить новичков «на путь истинный».

Меня всегда удивляло, что такой сложный процесс, как приготовление цитологических препаратов, отдается на откуп цитотехникам, ведь они, как правило, наименее обученный персонал. Даже у цитотехнологов, руководящих работой цитотехников, знаний зачастую недостаточно. При должном контроле цитотехники могут готовить препараты отличного качества. Однако цитотехнологи, цитологи и гистологи нередко сами бывают плохо обучены техническим тонкостям метода. И что самое удивительное, даже сейчас, спустя 60 лет после основания первой школы цитотехнологии, не издано ни одного стандартизованного руководства по скрининговому методу Пап-тест.

Согласно CLIA '88 (Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 — «Поправки к закону по совершенствованию клинических лабо-

раторий 1988 г.)\*, «учреждения, в которых проводится сбор биоматериала и/или приготовление образцов, не прошедшие проверку, не могут считаться лабораториями». С точки зрения Департамента здравоохранения и медицинских служб, «лаборатория — учреждение для проведения биологических, микробиологических, серологических, химических, иммуногематологических, гематологических, биофизических, цитологических, гистологических и других видов исследований биоматериала в целях диагностирования, профилактики и лечения заболеваний или оценки состояния здоровья человека. Лабораторные исследования также включают процессы выявления, измерения или описания наличия либо отсутствия различных веществ в организме человека».<sup>3</sup>

CLIA '88, таким образом, возлагают ответственность за качество препаратов на тех специалистов, которые занимаются непосредственно диагностикой, и не учитывают тот факт, что цитологические препараты далеко не всегда соответствуют требованиям к качеству и целям исследования. Интерпретация плохо окрашенных Пап-мазков иногда бывает причиной ложноотрицательных результатов. Так, например: «Хотя окрашенные препараты редко становятся предметом судебных разбирательств, их качество будет одним из основных критериев оценки при пересмотре препаратов экспертной группой для удовлетворения иска».<sup>4</sup>

Эта книга предназначена для всех, кто вовлечен в процесс подготовки учащихся и переподготовки специалистов: цито- и гистотехников/технологов, цитологов, гистологов и биологов — всех, кому приходится сталкиваться на практике с препаратами плохого качества. Возможно даже, некоторым покажется, что информация, приведенная в книге, изложена более подробно, чем требуется. Однако такое детальное изложение я делаю намеренно. Если эта информация не будет напечатана на бумаге, она может быть потеряна для будущих поколений.

Так уж сложилось исторически, что не все методы подготовки клеток для микроскопического исследования имели теоретическое обоснование. Логика методического процесса не всегда бывает очевидной. В итоге получают препараты неадекватного качества, которые мы просто не можем использовать по назначению. Процесс приготовления цитологических препаратов к тому же осложняется большим разнообразием локализаций, из которых берется биоматериал, различиями в клеточном составе образцов, составе сохраняющих сред.

«В середине 40-х годов, когда цитологический метод еще не был широко распространен и не был одобрен, д-р Папаниколау представил доклад о возможности его применения для диагностики рака матки. Однако один из его коллег в ответ на этот доклад выступил с сообщением о невозможности выявления отдельных клеток с признаками

---

\* Федеральный закон США. — *Прим. ред.*

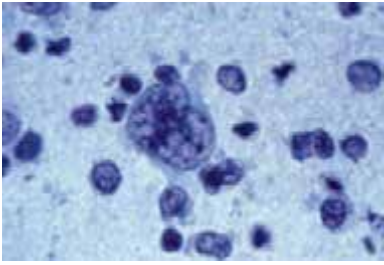
злокачественности. Это привело д-ра Папаниколау в замешательство. Для выяснения причины расхождения данных он отменил свой отъезд и на следующее утро отправился в лабораторию оппонента. Они вместе сели за микроскоп с коробкой слайдов. Через несколько минут д-р Папаниколау сказал: «Я счастлив, коллега, что мы с Вами, наконец, пришли к единому мнению: по препаратам такого низкого качества я бы тоже не смог поставить цитологический диагноз». <sup>5</sup> Истина вне времени.

Силы, вкладываемые в приготовление качественных цитологических препаратов, окупаются сторицей при микроскопии. В сравнении с драгоценными временными затратами на просмотр препаратов процесс их приготовления обходится довольно дешево. Приготовление качественных препаратов не потребует от вас больше денег или времени, в то время как препараты неудовлетворительного качества, очевидно, могут обойтись лаборатории гораздо дороже и привести к драматическим последствиям. Рекомендации CLIA '88 и оценка профессионального уровня сотрудников, тем не менее, позволят существенно улучшить качество приготовления препаратов и повысить эффективность микроскопии, что наилучшим образом скажется на результатах скрининга и развитии навыков персонала лаборатории.

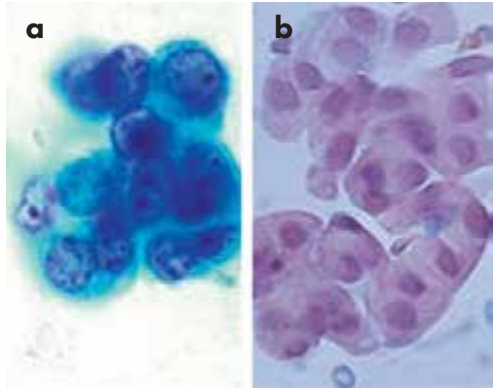
Читатели, наверняка, знакомы с двумя книгами Джона Р. Бейкера (1900–1984), которые актуальны и по сей день: «Технология в цитологии: принципы, лежащие в основе наиболее распространенных методов» <sup>6</sup> и «Принципы микротехники в биологии: учение о фиксации и окраске препаратов». <sup>7</sup> Достижения д-ра Бейкера в этой области неоспоримы и, конечно же, оказали на меня значительное влияние. Я лично никогда не встречался с д-ром Бейкером, но однажды в переписке советовался с ним по поводу гематоксилина. Его рукописный ответ, данный мне 29 ноября 1972 г., и сейчас висит в рамке на стене передо мной.

В этой книге вы не встретите значков ® или ™ рядом с торговыми названиями, поскольку на этот счет существует рекомендация: *«Используйте в публикации торговые названия без символов товарных знаков»*. Согласно федеральному закону США о товарных знаках, ограничение торговых названий относится главным образом к их использованию в коммерческих целях. Например, журнал, публикующий фотографии, или производитель компьютеров в статье о камерах и разработке пленок не должны упоминать название Kodak® без соответствующего символа товарного знака, в противном случае есть риск нарушения прав правообладателя.

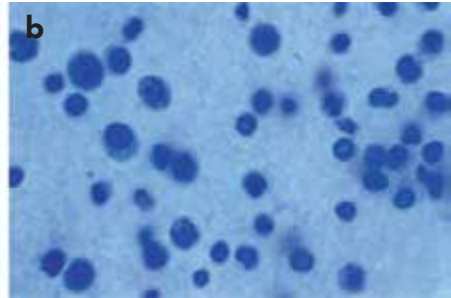
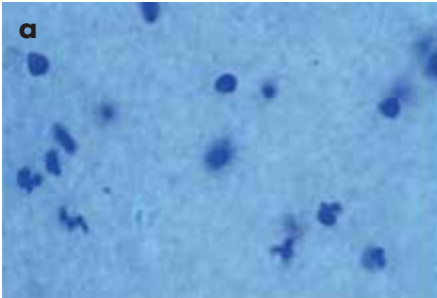
Символ ® или сочетание букв ™ либо SM не следует использовать в научных статьях и ссылках, но оригинальное название торговой марки следует писать с прописной буквы.



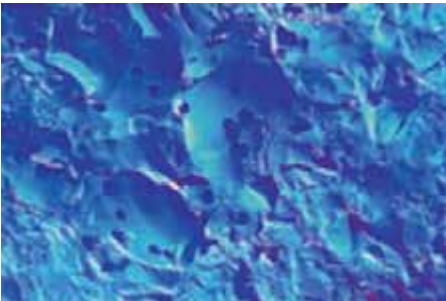
**B1**



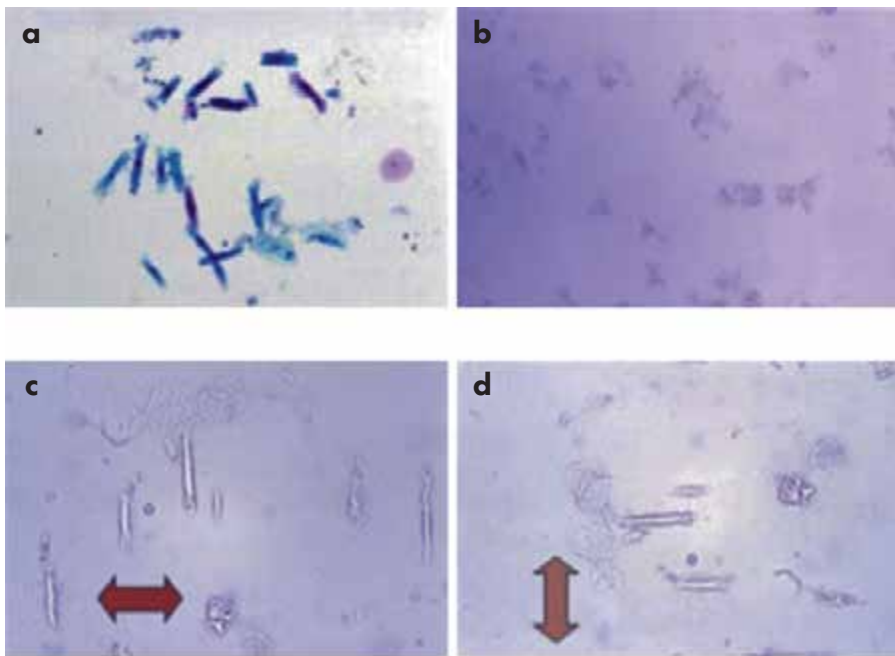
**Рис. 1.1.** (а) Качественно приготовленный препарат, соответствующий всем характеристикам, в сравнении с некачественным (б)



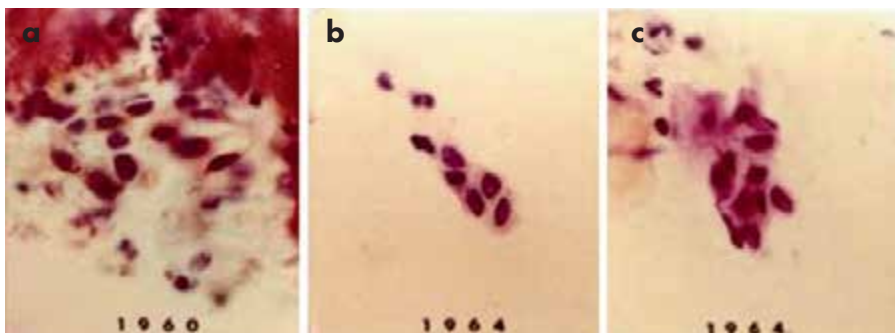
**Рис. 4.1** (а-б). На микрофотографиях представлены лейкоциты из образца крови, помещенного на фильтры Millipore. Образец в обоих случаях прошел стандартную процедуру пробоподготовки (за исключением промывки раствором, вызывающим гемолиз эритроцитов, содержащим сапонин): (а) физиологический раствор, (б) сбалансированный солевой раствор Хенкса (не содержащий Са и Mg). Физиологический раствор разрушает живые клетки



**Рис. 5.2.** Вот так выглядят клетки на поверхности матированного стекла. Микрофотография получена с помощью метода дифференциального интерференционного контраста. Исходное увеличение  $\times 100$

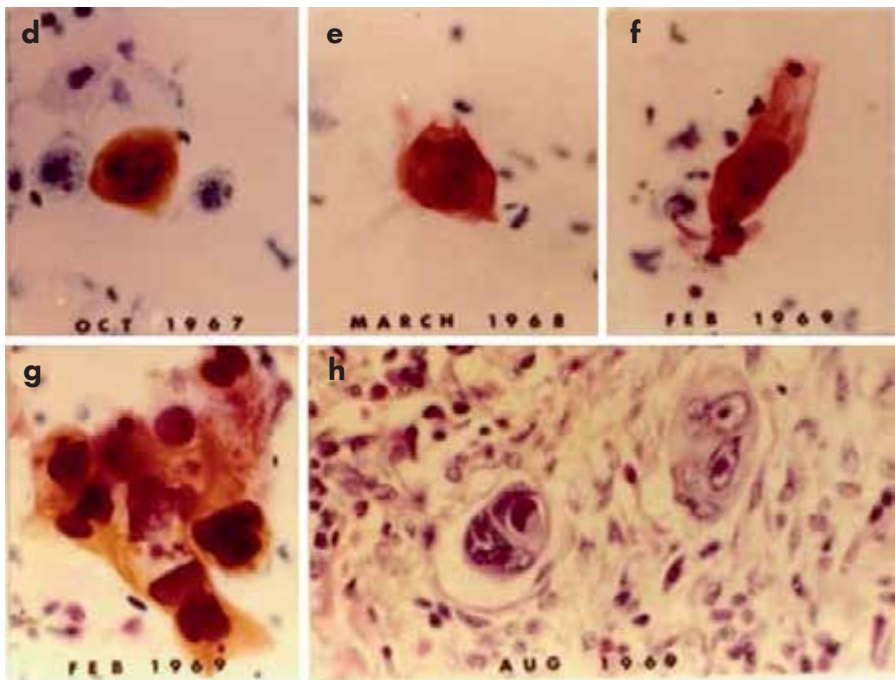


**Рис. 5.3.** Образец мокроты, приготовленный с помощью гомогенизирующей методики Саккоманно, и техника скольжения стекол. (а) Причудливые объекты неизвестного происхождения. (б) Образец мокроты до применения техники скольжения стекол. (с) Стекла перемещены друг относительно друга вдоль длинной стороны. (d) Стекла перемещены друг относительно друга вдоль короткой стороны



**Рис. 5.8 (a-c).** Сканированное изображение скомпонованных воедино оригинальных микрофотографий, предоставленных мне д-ром Саккоманно. Это один из четырех коллажей из небольшого буклета «на пружинках», озаглавленного «Развитие рака легкого». Это изображение дополнено соответствующим клиническим случаем (табл.)





**Рис. 5.8 (d-h).** Сканированное изображение скомпонованных воедино оригинальных микрофотографий, предоставленных мне д-ром Саккоманно. Это один из четырех коллажей из небольшого буклета «на пружинках», озаглавленного «Развитие рака легкого». Это изображение дополнено соответствующим клиническим случаем (*табл.*)

Случай 2	
Развитие болезни	
<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Мужчина, 40 лет</li> <li>◆ Работал на урановой шахте в течение 12 лет</li> <li>◆ Работал на шахте твердых пород в течение 7 лет</li> <li>◆ Закончил работать на шахтах в 1967 г.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Курил по 15 сигарет в день в течение 12 лет</li> <li>◆ Бросил курить в 1962 г.</li> <li>◆ Лобэктомия в 1969 г.</li> <li>◆ ВОЗ IA*</li> </ul>

\* IA — класс технических продуктов, токсичность которых определена как чрезвычайно опасная (ВОЗ, 1996). — *Прим. пер.*

# Глава 15. Просветление

---

*Подготовка объектов для исследования требует всех мыслимых и немыслимых предосторожностей; самые лучшие микроскописты могут обмануться, если будут слишком быстро принимать решение о том, что видят, не подтверждая свою правоту многократными экспериментами.*

Джордж Адамс, 1746 г.

## **Принцип № 6**

Для оптимизации получения изображения с помощью объективов микроскопа заключайте препараты под покровное стекло.

## **Практика**

Помещайте фиксированные и окрашенные препараты в органический растворитель, показатель преломления которого близок к показателю преломления белка после фиксации.

## ОСНОВНЫЕ ИСТОРИЧЕСКИЕ ВЕХИ

- 1665 г. — Гук погружает препараты в оливковое масло, чтобы сделать их прозрачнее: «Вы можете четко видеть...»<sup>1</sup>
- 1770 г. — Хилл использует скипидар для просветления тканей перед микроскопией.<sup>2</sup>
- 1877 г. — Меркель вводит в практику ксилол как просветлитель.<sup>3</sup>
- 1979 г. — появляется Нето-De, первый заменитель ксилола.

Перед заключением окрашенные цитологические препараты проводят через органический растворитель, который полностью замещает спирты. Кроме того, показатель преломления растворителя должен быть близок к показателю преломления белка после фиксации (1,536)<sup>4</sup> и смолы, используемой для заключения. Такое соответствие показателей — необходимый этап на пути к идеальному изображению. К другим условиям, важным для отличного изображения, относятся заключающая среда, покровное стекло, чистый микроскоп и освещение по Келеру.

Как правило, в качестве органического растворителя используют ксилол. Он в любых пропорциях смешивается с абсолютным спиртом

и является обычным растворителем в заключающих средах. Ксилол и сходные с ним по применению вещества (например, толуол) относят к просветлителям. В процессе просветления препарат становится не только более прозрачным, но и освобождается от оставшихся следов воды.

Термин «просветление» не очень точен. После фиксации белок становится бесцветным и прозрачным, поэтому дополнительно осветлять его не требуется. Однако сухой белок рассеивает свет и выглядит непрозрачным (за исключением случаев, когда свободные области внутри и вокруг белков не заполнены веществом с близким показателем преломления).<sup>5</sup> Дифракция — это отклонение света от прямолинейного направления, когда он проходит сквозь прозрачную среду и встречает в ней препятствие. В нашем случае прозрачная среда — это воздух, а препятствие — фиксированный белок. В результате мы видим рассеянный свет или получаем нерезкое изображение. И дифракция, и рефракция связаны с изменением направления света. Но рефракция возникает в том случае, когда свет проходит через границу между двумя прозрачными средами с разными показателями преломления.

Ванны с ксилолом меняют так часто, как это принято в конкретной лаборатории. Интервал между сменой ванн можно увеличивать (но не безгранично). Чтобы реже менять ксилол, все неокрашивающие промысловые растворы используют в тройном количестве; контейнеры заполняют до максимального уровня, чтобы замедлить загрязнение и минимизировать перенос в следующую серию посуды. Затраты на утилизацию могут превысить закупочную цену, поэтому нередко лаборатории вместо ксилола применяют более дешевые альтернативы.

## АЛЬТЕРНАТИВЫ КСИЛОЛУ

*Трет-бутиловый спирт.* Иногда в качестве просветлителя используют трет-бутиловый спирт (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH).<sup>6</sup> Его применение было описано в письме редактору журнала «Acta Cytologica» в 1983 г. В то время на рынке стали появляться первые заменители ксилола. Однако, как отметил автор письма, впервые трет-бутиловый спирт был использован на 27 лет раньше, когда Целалье применил его для деградации препаратов с хромосомами растений.<sup>7</sup> (Хороший пример того, как много информации можно почерпнуть из «старой» литературы, если знать, где искать.) Мне не доводилось использовать трет-бутиловый спирт, поэтому я не могу судить о его преимуществах и недостатках.

*Заменители ксилола.* В некоторых лабораториях используют заменители ксилола; иногда они требуют особой утилизации. Заменители ксилола достаточно популярны, но все они имеют ограничения, и ни один из них не универсален. Так, возможные вредные воздействия ксилола

изучены лучше. (Производители утверждают обратное и считают, что обращаться с заменителями следует так же, как с ксилолом.<sup>8</sup>) Заменители ксилола выпускаются под разными торговыми названиями, но в целом их можно разделить на четыре класса. Так, в состав заменителей ксилола могут входить следующие химические вещества:<sup>9</sup>

- лимонены;
- смеси алифатических углеводородов;
- смеси ароматических углеводородов;
- смеси минеральных масел.

Все альтернативы ксилола имеют ограниченный срок эксплуатации. Кроме того, их необходимо утилизировать и заменять, что достаточно дорого.

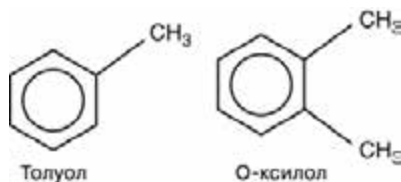
## КСИЛОЛ

Ксилол смешивается с абсолютным спиртом и с растворителем в заключающих средах (обычно в качестве растворителя тоже используют ксилол или, реже, толуол). И ксилол, и толуол — ароматические углеводороды, в основе их строения — бензольное кольцо (рис. 15.1).

Когда цитологический препарат погружают в среду со сходным показателем преломления, он становится прозрачным и свет беспрепятственно проходит через клетки (табл. 15.1).

Обычно лаборатории покупают гистологический ксилол (смесь трех изомеров) вместо более дорогостоящих очищенных растворов одного изомера. Гистологический ксилол содержит до 15 % бензола, который оказывает канцерогенное действие на костный мозг. Поэтому, чтобы не вдыхать пары, работать с ксилолом следует с включенной вытяжкой. Ксилол огнеопасен.<sup>10</sup>

Ксилол не вступает в химические реакции с биологическими красителями, поэтому при необходимости окрашенные цитологические препараты можно оставлять в ксилоле на ночь. Препараты, погруженные



**Рис. 15.1.** Толуол содержит одну метильную группу, ксилол — две. На рисунке метильные группы ксилола находятся в орто-положении, но они могут быть отделены друг от друга одним или двумя атомами углерода бензольного кольца (мета- или параположение соответственно). Орто-, мета- и параксилол являются изомерами

**Таблица 15.1.** Прозрачность цитологического препарата возрастает, когда показатель преломления среды приближается к показателю преломления клеток

Среда	Показатель преломления	Внешний вид клеток (показатель преломления 1,52–1,54)
Воздух	1,00	Матово-белые
Вода	1,33	Опалесцирующие
Спирт	1,36	Менее прозрачные
Ксилол	1,49	Прозрачные

Слово «ксилол» произошло от греч. *xylon* — дерево. Этот греческий корень есть и в слове «гематоксилин», которое переводится как «крово-красное дерево».

в ксилол, испытывают примерно те же воздействия, что и накрытые покровными стеклами. Ксилол, попавший под покровное стекло, сохраняется в препарате не меньше месяца. Разумеется, длительного воздействия ксилола следует избегать, если на стекла наклеены метки, адгезив которых растворяется в ксилоле.

Иногда в ванны с ксилолом попадает вода. В ряде случаев она переносится из посуды с водными растворами спиртов, где препараты находились раньше. Однако чаще всего попадание воды в раствор ксилола — результат поглощения влаги из воздуха. Скорость этого процесса зависит от географического положения (чем южнее, тем быстрее поглощается влага), времени года (чаще всего это происходит летом) и других условий, связанных с работой конкретной лаборатории. В ксилоле вода превращается во взвесь крошечных капель, которые видны только под микроскопом. Если на препараты с покровными стеклами посмотреть невооруженным глазом, вода в них выглядит как беловатое пятно. При микроскопии капли воды хорошо видны и выглядят как шарики различного диаметра (рис. 15.2, см. цветную вклейку).

## «ВЕЧНЫЙ» КСИЛОЛ<sup>11</sup>

Если из ксилола можно удалить воду, то почему бы не экономить и не использовать его неопределенно долго? С ксилолом работает множество (если не большинство) лабораторий, и все они сталкиваются с проблемой: когда утилизировать ксилол? Чтобы ответить на этот вопрос, нужно понимать, во-первых, какова роль ксилола, а во-вторых, что снижает его качество.

Мы уже обсуждали, зачем нужен ксилол и какова его роль. Ксилол можно назвать некачественным, если под его воздействием красители выцветают или вымываются из цитоплазмы, а также если происходит перекрестное загрязнение других препаратов. Когда ксилол использу-

ется несколько раз, в нем накапливаются остатки клеток. Это повышает риск перекрестного загрязнения. Микропрепараты, содержащие капли воды, нестабильны и недолговечны. С них следует снять покровные стекла, повторно провести через ксилол и спирты, просветлить. После этого покровные стекла можно наклеить заново.

Раньше, чтобы удалить из ксилола воду и взвеси, его фильтровали через лабораторную фильтровальную бумагу. Поскольку вода и ксилол не смешиваются (так же, как уксус и масло), фильтровальная бумага впитывала капли воды и пропускала безводный ксилол.<sup>12</sup> Ксилол из ванн необходимо фильтровать каждый день; на практике, однако, этого часто не делают. *Как следствие, ванны с ксилолом не поддерживаются в должном состоянии и утилизируются слишком рано.*

Небольшое историческое отступление: «В средние века в качестве фильтра использовали кусочек войлока. Этим объясняется историческое значение слова “фильтр” — войлок. В современном значении слово “filter” пришло в английский язык еще до эпохи Шекспира. Тогда существовало несколько вариантов его написания: philtre, philter, filter, fylter или fylture».<sup>12</sup>

*Адсорбирующие гранулы.* Цеолитовые адсорбенты — это синтетические молекулярные сита, гранулы алюмосиликатов с микропористой кристаллической структурой. Они адсорбируют воду из органических растворителей (например, из ксилола) (рис. 15.3). Благодаря регулярной кристаллической структуре адсорбционная способность такого сита легко предсказуема и надежна. Катионы металлов компенсируют отрицательный заряд каркасной структуры цеолита. Кроме того, катионы, создавая электрическое поле, обладают высокой аффинностью к полярным молекулам (например, молекулам воды). В зависимости от типа кристаллической структуры и вида катионов металла молекулярное



**Рис. 15.3.** Диаметр адсорбирующих гранул — 2 мм

## ПРОЦЕСС ПРОСМОТРА ПРЕПАРАТОВ: ПОИСК И ВНИМАНИЕ, НЕПРАВИЛЬНОЕ ТОЛКОВАНИЕ И НЕДООЦЕНКА

Существуют многочисленные научные труды, посвященные разным видам процессов визуального наблюдения, результаты которых никак не отразились на изучении производительности этих процессов. Обратите внимание, что профессиональный жаргон включает такие выражения, как процесс поиска, время поиска, цель, фиксация, саккады (скачкообразные движения глазных яблок), линии просмотра, дисплей, перенасыщенный деталями дисплей, нецелевые объекты, конкуренция, свободный поиск, неупорядоченная последовательность и объем отображаемой информации.<sup>32</sup> Особенно важным с точки зрения продуктивности просмотра препаратов является такое понятие, как отрезок времени, необходимого для выполнения отдельных действий. Исследователи, к сожалению, эту величину обычно недооценивают и просто включают в такую категорию, как среднее время просмотра препарата. Например:<sup>26,33-35</sup>

- интервал времени между наблюдениями — 1–2 мин;
- перемещение препарата от поля к полю — 180 мс;
- среднее время наблюдения на 1 поле зрения (т. е. время фиксации взгляда) — 230 мс (т. е. одно мгновение). Цитотехнологу обычно требуется многократно последовательно фиксировать взгляд для охвата одного поля зрения. В зависимости от микроскопической картины иногда может быть достаточно зафиксировать взгляд однократно или несколько раз;
- среднее время наблюдения на 1 поле зрения в случае хорошо различимых объектов —  $\geq 350$  мс;
- время одной саккады — около 50–60 мс (саккады — это движения глазных яблок между фиксациями взгляда);
- среднее время работы на 1 препарат при использовании объектива 4x — 4,97 %;
- среднее время работы на 1 препарат при использовании объектива 10x — 91,0 %;
- среднее время работы на 1 препарат при использовании объектива 20x — 2,32 %;
- среднее время работы на 1 препарат при использовании объектива 40x — 0,53 %;
- среднее время работы на 1 препарат при работе с разными объективами — 1,18 %.

Иначе говоря, цитотехнолог располагает коротким отрезком драгоценного времени, вглядываясь в клетки, чтобы обнаружить в них пато-

логию. Просмотр препаратов — это как бы игра, в которой один выигрывает, а другой проигрывает. По сути это означает, что скорее большое количество препаратов, просмотренных за час, ставит под угрозу качество, чем малое. Принцип соперничества представляет собой отрицание закона Паркинсона: время на просмотр Пап-мазка становится все меньше, если разница между числом запланированных и уже завершенных тестов становится в течение дня все больше и больше. Обычно, согласно этому закону, работа заполняет все время, отпущенное на нее.

Промежутки времени, необходимые для выполнения каждой из многих задач, связанных с наблюдением, бывают очень жесткими. Просмотр большого количества препаратов за 1 ч может отразиться на пропуске деталей (например, неполное исследование материала). Если бы знать заранее, какие из 90 % мазков не имеют патологии, то можно было бы «срезать углы» — идти по короткому пути. Но поскольку знать этого мы не можем, мы обязаны относиться к каждому мазку с особым вниманием. Ведь каждый из них исследуется только 1 раз.

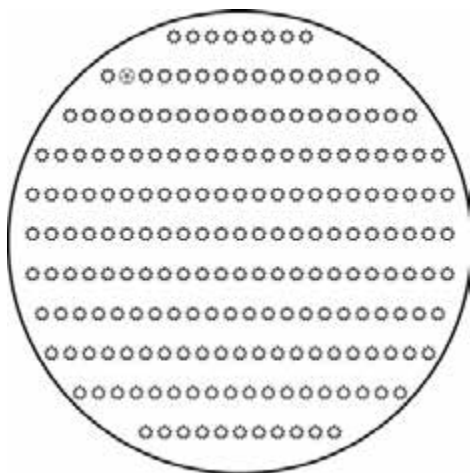
Единственная причина для существования времени — это чтобы все не случилось одновременно.

*Альберт Эйнштейн*

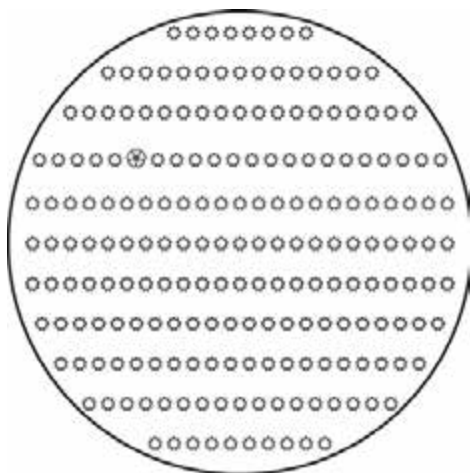
*Обучение процессу поиска.* Когда я начал изучать методы приготовления цитологических препаратов, процесс преподавания включал упражнения по тахоскопии (дословно «быстрый взгляд»). Занятия проводились в темном помещении старой гематологической лаборатории, в которой также работал д-р Максвелл Винтроуб, автор «Клинической гематологии». Микрофотографические изображения появлялись на экране на долю секунды. Нас просили затем описать, что и где мы увидели в тех случаях, когда присутствовали патологические клетки. На рис. 20.13–20.15 предпринята попытка проиллюстрировать некоторые ключевые понятия.

Все цитотехнологи, если им показать пропущенные ими патологические клетки, внутренне отреагируют одинаково: 1) я распознаю такие клетки; 2) я не знаю, как я мог их пропустить; 3) я не знаю, что я могу сделать для того, чтобы в следующий раз точно не пропустить.<sup>14</sup> Действительно, практически невозможно что-то сделать профилактически для того, чтобы обеспечить 100%-ю точность результатов просмотра препаратов. Именно поэтому я думаю, что проверка квалификации гинекологов, которую предписывают CLIA '88, особого смысла не имеет. Для того чтобы сдать искусственный тест, не требуется такого умения, которое необходимо в реальной жизни при просмотре препаратов, и он никак не может повлиять на вероятность получения исследователем ложноотрицательных результатов.

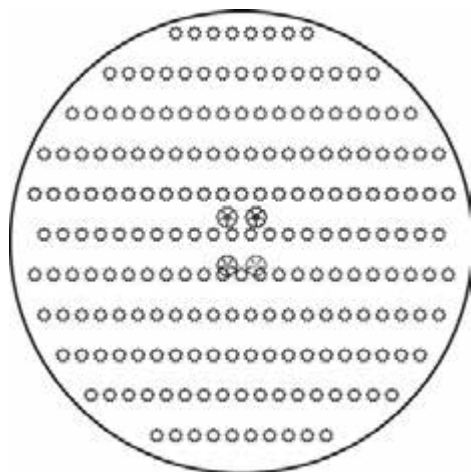




**Рис. 20.13.** Здесь представлено искусственное изображение одной патологической клетки (⊛), находящейся на одном поле с 204 здоровыми клетками (☆). Этим мы хотим показать, что такие объекты, которые находятся на периферии, хотя и не отличаются от других ни размером, ни формой, ни оптической плотностью, не попадают в зону видимости исследователя и обычно остаются незамеченными. Патологические клетки попадают в поле зрения микроскопа, но остаются за пределами значительно меньшего по площади поля зрения (т. е. зоны видимости)



**Рис. 20.14.** Если патологическая клетка расположена ближе к зоне видимости исследователя и она заметно крупнее по размеру, ярче и отчетливее своих соседей, то она, скорее всего, будет идентифицирована



**Рис. 20.15.** Самая высокая степень вероятности распознавания патологических клеток, которая, тем не менее, не может быть гарантирована, прослеживается в тех случаях, когда патологические клетки выделяются в зоне наилучшего зрительного восприятия исследователя. Многочисленные крупные клетки с патологической морфологией, которая отличает их от доброкачественных, если они расположены в центре зоны видимости исследователя, будут им, вероятно, идентифицированы (хотя и необязательно). Я присутствовал на судебном разбирательстве, причиной которого были ложноотрицательные результаты Пап-мазка, в которых явные злокачественные клетки были расположены одна к одной