

1 – ЗАО «НПО
«ДОМ ФАРМАЦИИ»,
188663, Россия,
Ленинградская обл.,
г.п. Кузьмоловский, б/н,
корп. 245

1 – CJSC «SPA
«HOUSE OF PHARMACY»,
245, Kuzmolovskiy,
Vsevolozhskiy district,
Leningrad region, 188663,
Russia

* адресат для переписки:
E-mail: Varjasha@yandex.ru
Тел./факс: (812) 603 24 33,
603 24 32
Тел.: 8 (931) 538 52 17

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО АРХИВА

В.В. Шедько^{1*}, Я.А. Гущин¹, А.А. Мужикян¹, М.Н. Макарова¹

Резюме. При проведении доклинических исследований в России необходимым условием является соблюдение норм, установленных приказом Минздравсоцразвития России № 708 «Об утверждении правил лабораторной практики». Одним из важнейших аспектов качества выполняемых исследований является возможность реконструкции исследования после его завершения на основании архивированных материалов. Требованиями приказа Минздрава России № 354н от 06.06.2013 г. «О порядке проведения патолого-анатомических вскрытий» предусмотрено хранение биологических материалов в 10% растворе формалина до окончания гистологического исследования, а также хранение микропрепаратов и парафиновых блоков в течение трех лет. В проведенном нами исследовании установлены и описаны наиболее часто встречаемые искусственные изменения, возникающие в архивированном материале с течением времени при соблюдении рекомендаций по условиям хранения.

Ключевые слова: гистологический архив, ретроспективный анализ, доклинические исследования.

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF HISTOLOGIC ARCHIVE

V.V. Shedko^{1*}, Ya.A. Gushchin¹, A.A. Muzhikyan¹, M.N. Makarova¹

Abstract. Pre-clinical studies in Russia are required to be compliant with the Ministry of Health of Russia order N 708 «On approval of the rules of laboratory practice». One of the most important aspects of the quality of carried out research is possibility to reconstruct the study after its completion on the basis of archived materials. Order of Ministry of Health of Russia issued on 06.06.2013 N354n "On the procedure of autopsy" requires storage of biological materials in 10% formalin solution before the end of the histological study and also storage of micropreparations and paraffin blocks for 3 years. Our study identifies and describes the most frequently encountered artificial changes that occur in the archived material with the passage of time in compliance with the recommendations on storage conditions.

Keywords: histological archive, retrospective analysis, pre-clinical studies.

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с пунктом 9 статьи 3 федерального закона «Об архивном деле в Российской Федерации» [3] архивом является «учреждение или структурное подразделение организации, осуществляющее хранение, комплектование, учет и использование архивных документов».

ГОСТ 31882-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Организация и контроль архивов» дает следующее определение архива: «установленная зона или помещение... для безопасного хранения записей и данных». Обязательному хранению согласно этому документу подлежат, помимо записей на бумажных носителях, такие материалы, как влажные ткани, парафиновые блоки и прочее. Также в документе имеются рекомендации по сохранению материалов до тех пор, пока существует вероятность запроса от регулирующих органов на проведение аудитов. Данные рекомендации соответствуют приказу Минздравсоцразвития России № 708

«Об утверждении правил лабораторной практики». Требованиями приказа Минздрава России № 354н от 06.06.2013 г. «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий» предусмотрено хранение биологических материалов в 10% растворе формалина до окончания гистологического исследования и хранение микропрепаратов и парафиновых блоков в течение трех лет [2, 5].

Вместе с тем в доступной литературе мы не обнаружили полных данных о сохранности гистологических образцов при хранении в 10% растворе формалина, в виде микропрепаратов и парафиновых блоков [6].

С учетом вышесказанного нами была поставлена задача оценить сохранность и качество архивируемого материала, получаемого в ходе комплектации архива и имеющего различную давность хранения.

В качестве наибольшего срока хранения был выбран промежуток времени, равный трем годам [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения ретроспективной валидации гистологического архива нами были отобраны влажный материал, фиксированный в 10% растворе формалина, гистологические блоки и микропрепараты на стеклах. Все перечисленные материалы были представлены одинаковым набором внутренних органов лабораторных животных и состояли из селезенки, печени, легких, кишечника, головного мозга, почек. Указанные архивные материалы были поделены нами на группы, соответствующие давности хранения. Для каждой временной группы было отобрано по 6 животных, чьи органы и ткани были представлены в виде влажного архива. Одному образцу с зафиксированными органами соответствовали 3 парафиновых блока с биоматериалом. Каждому парафиновому блоку соответствовало одно стекло с гистологическим препаратом, окрашенным стандартным красителем – гематоксилин-эозином. Наибольший срок хранения среди проанализированных нами материалов составил три года, наименьший – 3 месяца. В качестве контроля использовали свежий гистологический материал, не подвергавшийся хранению в гистологическом архиве. Степень выраженности обнаруженных артефактов оценивалась по сумме баллов, которые выставляли для каждого стекла или блока. Была использована шкала от 0 до 4, где 0 соответствовал отсутствию артефактов, а 4 – наиболее заметным дефектам в материале. Время хранения в архиве определяли согласно архивным журналам учета гистологического материала. Количественные характеристики исследуемых групп приведены в таблице 1. Микроскопию выполняли при помощи светооптического микроскопа Axio Scope (Германия). Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры AxioCam ICc1 (Германия).

Таблица 1.

Количественные характеристики исследуемого материала

Длительность хранения в архиве	Количество материала		
	Влажный	Блоки	Стекла
3 года	6	18	18
2,5 года	6	18	18
2 года	6	18	18
1,5 года	6	18	18
1 год	6	18	18
6 месяцев	6	18	18
3 месяца	6	18	18
Свежий, неархивированный материал	–	–	18

Необходимо отметить, что согласно имеющимся за три года показаниям психрометрического гигрометра отклонений от нормы параметров температуры и влажности не наблюдалось. Все перечисленные архивные материалы хранились изолированно друг от друга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате наших исследований установлено, что наиболее часто встречаемым артефактом, возникающим в процессе хранения биоматериала, зафиксированного в 10%-м растворе формалина, является формалиновый пигмент. Данный пигмент представляет собой мелкие, четко очерченные гранулы коричневого или черного цвета, расположенные, как правило, в эритроцитах или рядом с ними.

Для доказательства природы пигмента мы использовали метод сравнения вновь изготовленных нами срезов с исходными микропрепаратами. Такая методика позволила нам не прибегать к использованию специфических методов окраски, таких как окраска по Перлсу. Необходимо отметить, что при использовании метода сравнения важно изготавливать микропрепараты из тех органов и тканей, которым соответствуют уже имеющиеся гистологические микропрепараты сравнения.

В ходе микроскопии гистологических стекол мы обнаружили неодинаковую частоту встречаемости формалинового пигмента в различных органах: в большинстве случаев указанный пигмент встречался в селезенке, реже – в печени и легких, единичные отложения указанного пигмента наблюдались в головном мозге. При этом количество формалинового пигмента резко возрастало после 1,5–2 лет хранения материала, а максимума достигало в материале третьего года хранения (рисунок 1).

Для вновь изготовленных препаратов, чей срок хранения превышал 1,5 года, помимо отложений формалинового пигмента в тканях, нами были выявлены следы аутолиза тканей: распад микроструктур клеток, кариопикноз ядер, эозинофилия цитоплазмы. В кишеч-

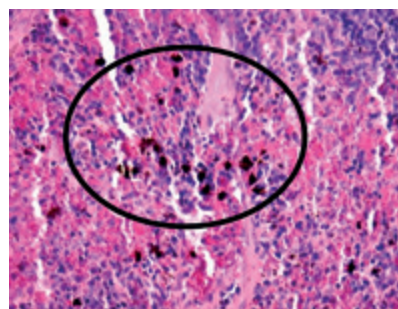


Рисунок 1. Селезенка. Вновь изготовленный микропрепарат из материала влажного архива. Срок хранения – 3 года. Область локализации формалинового пигмента выделена черным цветом. Характерна высокая концентрация пигмента. Ув. 200. Окраска ГЭ

ном эпителии часто наблюдалась вакуолизация цитоплазмы, в отдельных случаях лизису подвергались обширные площади ткани (рисунок 2). Указанные дефекты гистологических препаратов также имели прямую зависимость от срока хранения и были наиболее выражены у препаратов со сроком хранения 3 года. При оценке указанных дефектов мы также использовали метод сравнения с соответствующими гистологическими препаратами.

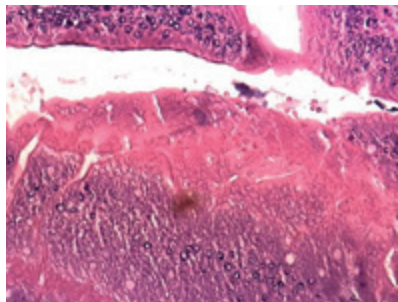


Рисунок 2. Тонкая кишка. Вновь изготовленный микропрепарат из материала влажного архива. Срок хранения – 3 года. Характерен лизис тканей тонкой кишки. Ув. 200. Окраска ГЭ

При изготовлении гистологических срезов из вновь вырезанного материала, хранившегося во влажном архиве свыше 1,5 лет, была отмечена чрезмерная фиксация, что сказывалось на качестве препаратов и выражалось в чрезмерном уплотнении и хрупкости материала. Указанные дефекты затрудняют изготовление срезов толщиной 3–5 мкм и приводят к утолщению срезов и к появлению разрывов и деформации материала (рисунок 3).

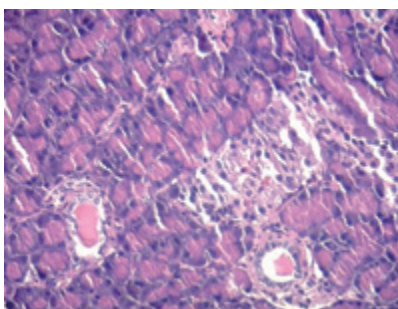


Рисунок 3. Печень. Вновь изготовленный микропрепарат из материала влажного архива. Срок хранения – 3 года. Трещины и разрывы в срезе. Ув. 100. Окраска ГЭ

При изготовлении микропрепаратов из парафиновых блоков, хранившихся более 2,5 лет, можно было наблюдать разрывы и трещины в срезах, что может быть связано со сроком хранения и обусловлено продолжающимся воздействием остаточного количества формальдегида [6]. При расплавлении с повторной заливкой биоматериала новым парафином и изготовлении микропрепаратов качество изготовленных срезов оценивалось как удовлетворительное.

В исследованных нами готовых микропрепаратах, хранившихся более 1,5 лет, наблюдалось отслоение покровных стекол и нарушение целостности заключенных срезов (рисунок 4). Артефакты можно было убрать при перезаключении препаратов (рисунок 5).

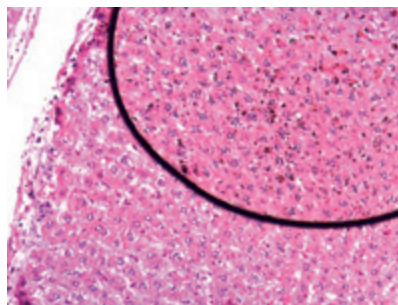


Рисунок 4. Печень. Готовый микропрепарат. Срок хранения – 2,5 года. Отслоение покровного стекла. Ув. 100. Окраска ГЭ

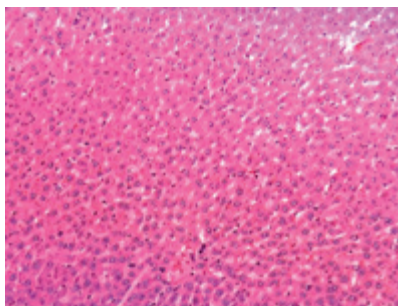


Рисунок 5. Печень. Готовый, перезаключенный микропрепарат. Срок хранения – 2,5 года. Ув. 100. Окраска ГЭ

В качестве эталонных микропрепаратов мы использовали «свежие», неархивированные гистологические стекла. В указанном материале не было выявлено каких-либо артифициальных изменений, отмеченных в материале с более долгими сроками хранения (рисунок 6, 7).

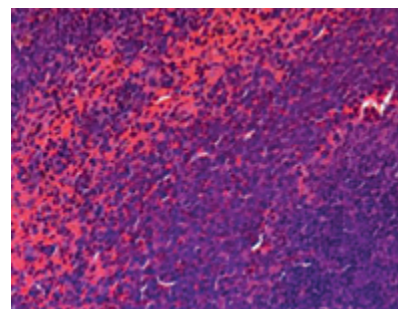


Рисунок 6. Селезенка. Свежий материал. Ув. 200. Окраска ГЭ

Нами установлено, что использованная тара для хранения влажного архива не оказывает влияния ни на сохранность тканей, ни на качество изготовленных срезов. Для гистологических контейнеров и герметичных полиэтиленовых пакетов выраженность артифициальных изменений была сопоставима.

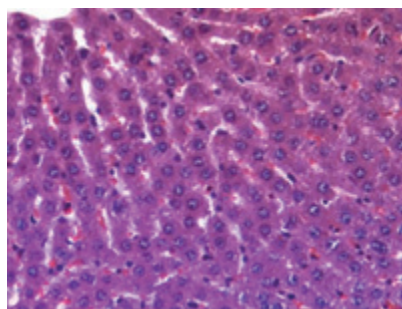


Рисунок 7. Печень. Свежий материал. Ув. 200. Окраска ГЭ

Выраженность искусственных изменений, возникающих с течением времени, приведена в таблице 2.

Таблица 2.

Выраженность искусственных изменений в архивном материале при различных сроках хранения (сумма баллов)

Срок хранения	Влажный архив			Готовые микропрепараты	Блочный архив
	Появление формалинового пигмента	Лизис структур	Уплотнение материала	Отслоение покровных стекол	Ухудшение качества парафина
3 года	33	11	22	7	11
2,5 года	26	10	18	6	11
2 года	17	5	6	3	3
1,5 года	10	3	2	0	0
1 год	8	0	0	0	0
6 месяцев	4	0	0	0	0
3 месяца	0	0	0	0	0
Свежий, неархивированный материал	0	0	0	0	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы методом ретроспективной валидации были выявлены и оценены артефакты, возникающие при хранении материалов в гистологическом архиве. В готовых микропрепаратах, парафиновых блоках и вновь изготовленных срезах материала из влажного архива при сроках хранения до 1 года искусственные изменения, связанные с хранением, отсутствовали. В материале влажного архива сроком хранения от 1 до 1,5 лет изменения носили единичный характер и были представлены появлением формалинового пигмента в ткани селезенки. В

дальнейшем, при хранении от 1,5 до 3 лет, количество артефактов увеличивалось: возрастало отложение формалинового пигмента, а также отмечались лизис структур и уплотнение материала. В готовых микропрепаратах по истечении 2,5 лет хранения нами было установлено отслоение покровных стекол. В парафиновых блоках по истечении того же времени выявлялось ухудшение качества парафина, приводящее к изготовлению микропрепаратов с дефектами в виде разрывов и трещин в срезах. Выраженность установленных нами артефактов не зависела от вида упаковки влажного архива. При использовании гистологических контейнеров и в случае применения герметичных полиэтиленовых пакетов отмечались одинаковые по своему составу и количеству изменения, возникающие по прошествии одинакового времени. Необходимо отметить, что артефакты, проявляющиеся в готовых микропрепаратах со сроком хранения 2,5 года и выше, возможно расценивать как затрудняющие, но не нарушающие диагностику. При этом артефакты, возникающие во вновь изготовленных микропрепаратах из хранящихся в течение 2,5 лет парафиновых блоков, затрудняют изготовление качественных срезов и последующую диагностику, но могут быть исправлены при перезаливке материала. Таким образом, оптимальный срок хранения биоматериала влажного архива, фиксированного в 10% растворе формалина, составляет один год; для парафиновых блоков и микропрепаратов – два с половиной года, но при необходимости может быть увеличен до трех лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».
2. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 6 июня 2013 г. № 354н «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий».
3. Федеральный закон от 22 октября 2004 г. № 125-ФЗ «Об архивном деле в Российской Федерации».
4. ГОСТ 31882-2012. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Организация и контроль архивов.
5. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 12 мая 2010 г. № 346н «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации».
6. А.Н. Ваганова. Гистотехнические решения для повышения качества препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из парафиновых блоков // Гены & Клетки. 2014. № 2. С. 96–101.