**День 1 (11.05.18)**

Производственную практику прохожу КГБУЗ «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро», общий руководитель - Соколов Владимир Дмитриевич провел знакомство с лабораториями гистологических исследований , а так же с персоналом и документацией. Старший лаборант- Белова Валентина Георгиевна распределила нас по лабораториям.

Также был проведен инструктаж по технике безопасности в патологоанатомическом бюро.

**Техника безопасности в патогистологической лаборатории.**

К работе в патологоанатомической и патогистологической лаборатории допускаются врачи, средний и младший медицинский персонал в возрасте не моложе 18 лет, прошедшие специальную подготовку по охране труда, в том числе на II квалификационную группу по электробезопасности, и не имеющие противопоказаний по состоянию здоровья.

Работники, вновь поступающие в лабораторию, должны пройти вводный инструктаж у инженера по охране труда с регистрацией в журнале вводного инструктажа по охране труда.

Каждый, вновь принятый на работу в лабораторию должен пройти первичный инструктаж по охране труда на рабочем месте. Повторный инструктаж должен проводиться не реже одного раза в 6 месяцев с регистрацией в журнале инструктажа на рабочем месте.

При работе в лаборатории на персонал возможно воздействие следующих опасных и вредных производственных факторов:

1. опасность заражения персонала при контактах с инфицированным и трупным биологическим материалом;
2. повышенное напряжение в электрической цепи, замыкание которой может пройти через тело человека;
3. повышенная нагрузка на органы зрения;
4. повышенный уровень содержания в воздухе рабочей зоны токсических и химических веществ (формалина, толуола, хлороформа, органических и синтетических красителей, эфира, этилового спирта, ртутных соединений и др.);
5. опасность взрыва при эксплуатации баллонов с газами, с образованием вредных веществ, содержание которых в воздухе рабочей зоны превышает предельно допустимые уровни.

Работодатель обязан бесперебойно обеспечивать работников отделения санитарной одеждой, спецодеждой, обувью и другими предохранительными средствами индивидуальной защиты:

1. халат хлопчатобумажный;
2. косынка или колпак хлопчатобумажные;
3. полотенце;
4. щетка для мытья рук; очки защитные;
5. маска (респиратор).

Персонал лаборатории обязан выполнять правила личной гигиены и ношения санитарной одежды и обуви, других средств индивидуальной защиты.

О каждом несчастном случае, произошедшем на производстве, пострадавший или очевидец несчастного случая извещает непосредственного руководителя работ, который обязан организовать первую помощь пострадавшему и при необходимости доставку его в лечебное учреждение.

В процессе работы персонал лаборатории обязан:

1. соблюдать требования охраны труда;
2. правильно применять средства индивидуальной и коллективной выполнять правила личной гигиены;
3. проходить обучение безопасным методам и приемам выполнения работ, инструктаж по охране труда, стажировку на рабочем месте и проверку знаний требований охраны труда;
4. проходить периодические медицинские осмотры (обследования);
5. соблюдать правила пожарной безопасности, знать места расположения средств пожаротушения;
6. владеть навыками оказания первой медицинской помощи при ожогах, отравлениях, поражении электрическим током и других травмах, знать местонахождение аптечки первой помощи, средств нейтрализации химических веществ.

**Требования безопасности перед началом работы:**

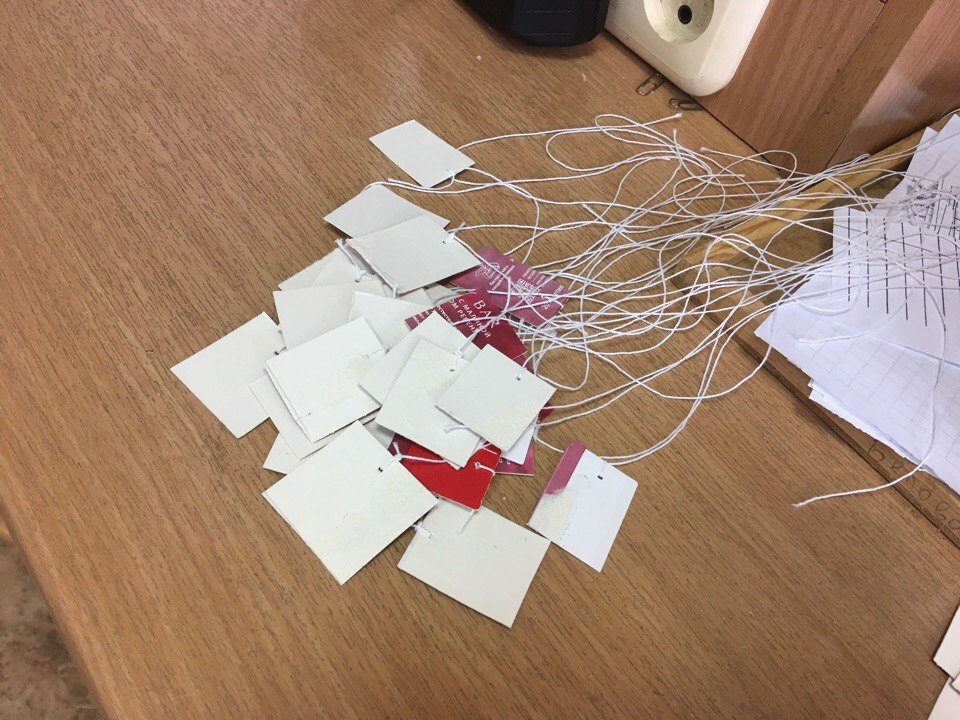
1. Перед началом работы во всех помещениях включается вентиляция.
2. Персонал лаборатории должен надеть санитарную одежду, сменить обувь, приготовить средства индивидуальной защиты.
3. Персонал отделения должен проверить готовность к работе оборудования, приборов. Персонал отделения должен проверить исправность систем вентиляции, водоснабжения, канализации и электроосвещения, о замеченных неисправностях сообщить заведующему подразделением и принять меры к осуществлению ремонтных работ.
4. Для персонала отделения рядом с умывальниками должно находиться мыло и щетка для мытья рук, полотенце (злектрополотенце). Тканевое полотенце заменяется ежедневно.

**Требования безопасности во время работы:**

1. Вырезка биопсийного и секционного материала должна производиться в специальной комнате, оборудованной вытяжным шкафом, либо при отсутствии таковой в предсекционной. Для вырезки должен иметься специальный стол с покрытием из нержавеющей стали, мрамора или толстого стекла и специальный набор инструментов, предназначенных только для этих целей.
2. Фиксация материала должна производиться в вытяжном шкафу, а хранение его в специальной фиксационной комнате, оборудованной приточно — вытяжной вентиляцией. Оставшийся после вырезки материал в качестве архива должен храниться в 10-процентном растворе формалина в хорошо закрытой маркированной посуде.
3. Архивные материалы, срок хранения которых истек, подлежат захоронению.
4. Работу с токсическими веществами следует проводить в резиновых перчатках, защитных очках, при необходимости в противогазе.
5. Наполнение сосудов ядовитыми веществами, концентрированными кислотами и щелочами следует проводить сифоном или специальными пипетками с резиновой грушей
6. Ключи и пломбир от этого помещения должны храниться у лица, ответственного за хранение и выдачу ядовитых веществ.
7. Расфасовка, измельчение, отвешивание и отмеривание токсических веществ производится в вытяжных шкафах в специально выделенных для этой цели приборах и посуде. Мытье и обработка посуды, которая использовалась в работе с ядовитыми веществами, должны производиться отдельно от другой посуды.
8. Разливка формалина, крепких кислот и приготовление растворов из них должны производиться в вытяжном шкафу.
9. Летучие вещества должны храниться в банках, закрытых притертыми пробками, и открываться лишь в момент непосредственного использования в работе.
10. Кислоты должны храниться в стеклянной посуде с притертыми пробками на нижних полках шкафов, отдельно от других реактивов и красок.
11. При разбавлении концентрированных кислот, во избежание разбрызгивания, следует кислоту вливать в воду, а не наоборот.
12. После работы с микротомом нож необходимо сразу же вынимать из микротома и помещать его в футляр для постоянного хранения. Оставлять нож в микротоме или переносить его без футляра по лаборатории запрещается.
13. Нагревательные приборы должны находиться в отдалении от взрывоопасных и горючих веществ, на подставках из огнеупорного материала.

**День 2 (12.05.18)**

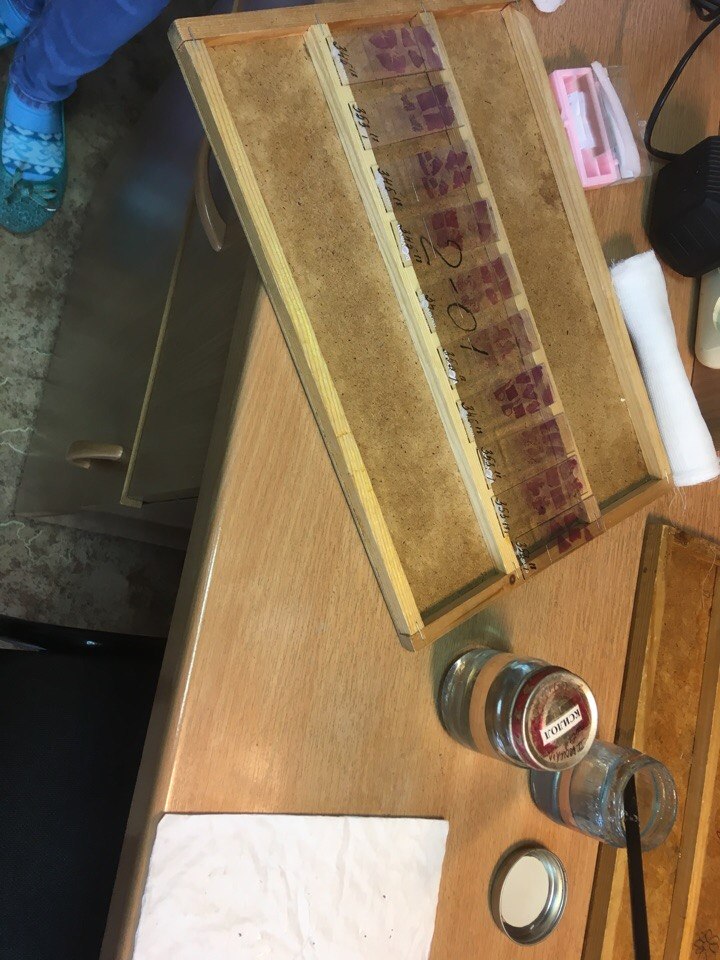
Делала специальные бирки, которые используются во время вырезки, если остается запас исследуемого материала. Я беру остатки исследуемого материала ложу его в марлю и завязываю специальными бирками. На бирках пишу число, месяц и год.



Затем проводила покрытие стекла полистиролом. Оно используется для заключения тканей под покровное стекло. Предназначена для длительного хранения препаратов после обезвоживания и просветления в ксилоле (десятки лет). Не растрескивается после высыхания и не смешивается с водой и глицерином.

Я наклеивала покровные стекла на предметные с готовыми окрашенными срезами, нанося каплю полистирола, обязательным условием является чтобы под покровным стеклом не было пузырьков, после аккуратно стираю лишний полистирол, так чтобы не было разводов.





**День 3 (14.05.18)**

Ходила на вырезку. На вырезки лаборант должен быть в халате, чепчике, сменной обуви, в перчатках и на лице должна быть маска. Сначала я искала материал по направления и затем ставила их на полочку, потом я пинцетом брала кусочки органов и складывала их в специальные кассеты и на маленькой бумажке подписывала номер данного материала и сколько кусочков лежит в кассете.



Затем я подсчитываю общее количество кусочков в каждой кассете, потом закрываю их и ложу в ведро с формалином на сутки.

После окончания вырезки я собирала кассеты, складывала их по фамилиям и затем унесла их в кабинет, где проходит вырезка, там я их положила в коробочки с данными фамилиями на кассетах.



**День 4 (15.05.18)**

**Взятие материала**

Материалом для гистологического исследования могут служить кусочки органов экспериментальных животных, материал, полученный путем прижизненного иссечения у человека кусочков тканей (биопсии), трупный материал, мазки жидких исследуемых материалов (крови, костного мозга). Хороший гистологический препарат должен отвечать таким требованиям:

- исследуемая ткань должна в максимальной степени сохранить свое прижизненное строение,

- срез должен быть тонким и прозрачным, чтобы через него проходил свет,

- изучаемые микроструктуры должны быть хорошо видны.

При микроскопическом исследовании тканей и органов большое значение имеет техника взятия материала. Поэтому при иссечении кусочков необходимо соблюдать следующие правила:

1. Объекты, подлежащие исследованию, должны быть свежими. Этому условию больше всего удовлетворяет материал, направленный прямо из операционной. Хуже обстоит дело с исследованием кусочков, взятых при вскрытии трупов, где приходится сталкиваться с посмертными изменениями.

2. Иссекая кусочки, нужно учитывать микроскопическое строение того или иного органа или ткани.

Например: кусочки из почки и надпочечника вырезают с таким расчетом, чтобы в них попали корковое, и мозговое вещество, для чего разрезы ведут перпендикулярно к поверхности указанных органов. Из органов, имеющих во всех своих частях одинаковое строение (печень, селезенка, щитовидная железа и др.) объекты можно иссекать как угодно, но желательно захватывать с капсулой. Стенки полых органов (мочевой пузырь, кишечник и др.) исследуют на поперечных сечениях.

3. Объекты из патологических и измененных тканей (опухоли, язвы) вырезают на границе с нормальными частями таким образом, чтобы были захвачены нормальные и измененные участки. При распространенном патологическом процессе рекомендуется брать несколько кусочков: одни

из наиболее пораженных отделов, другие - по границе с нормальной тканью.

4. Иссечение необходимо производить острыми инструментами, чтобы не травмировать ткани.

5. Недопустимо никакое сдавливание кусочков, а также очистка поверхности органа (например: слизистой оболочки, серозного покрова) пальцами, инструментами, тряпками.

6. Кусочки переносят в фиксирующую жидкость на лезвии ножа или пользуются анатомическими пинцетами.

**Фиксация гистологического материала**

После взятия гистологического материала, помещаем кусочек материала в 10% формалин для фиксации на 30-90 минут.

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение. Выбор фиксирующей среды зависит от задач исследования (например, при необходимости выявления гликогена объекты следует фиксировать не в формалине, а в этаноле).

Объём фиксирующей жидкости должен превышать объём кусочков не менее, чем в 10 раз. При этом следят, чтобы кусочки в растворе не слипались и не прилегали ко дну банки. Охлаждение фиксируемых в формалине объектов нежелательно, так как при этом замедляется проникновение фиксатора в ткани.

**День 5 (16.05.18)**

**Промывка материала в воде.**

После того как прошла фиксация материала, его промывают (чаще всего  в течение нескольких часов в проточной холодной воде) с тем, чтобы избавить от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей.

**Обезвоживание.**

Обезвоживание ткани производятся постепенно (чтобы не произошло сморщивания) путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50º, 60º, 70º, 80º, 90º, 96º, 100º.  В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка.

Мы использовали обезвоживающий аппарат для диагностических срезов и отдельно для операционных срезов.



**День 6 (17.05.18)**

**Подготовка предметных стёкол**

Предметные стекла, применяемые для получения гистологических препаратов, необходимо предварительно подготовить.

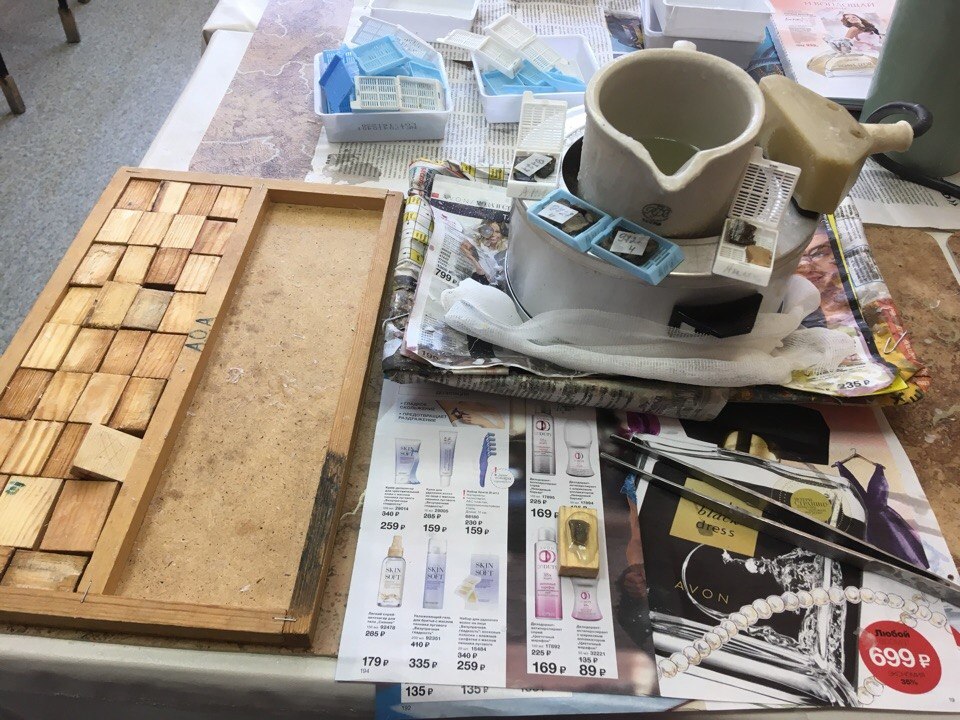
Для лучшей фиксации срезов на стекло я капаю маленькую капельку свеже-приготовленной сыворотки. Затем беру второе предметное стекло без сыворотки и аккуратно растираю капельку по стёклам, так чтобы оно не треснуло и получилось всё ровно и красиво. И так я делала с кажды стеклом



**День 7 (18.05.18)**

**Заливка исследуемого материала в парафин**

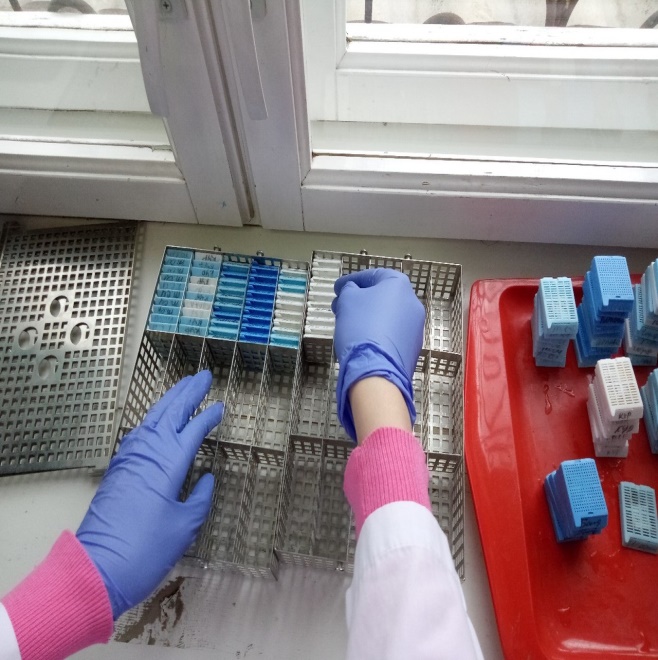
Для начала заливки в парафин я кладу кассеты с материалом на горячую водянную баню, для того чтобы они хорошо прогрелись и не прилипали друг к другу. После того как она прогрелась я открываю кассету и пинцетом беру сначала бумажку с номером и погружаю её в хорошо нагретый парафин, там мы круговыми движениями промываем и затем клеем на блок, потом я также беру пинцетом кусочек материала промываю его в парафине и ложу на блок, так чтобы он лежал ровно и заливаю сверху парафином.



**День 8 (19.05.18)**

После того ка исследуемый материал простоял сутки в формалине, я слила формалин в банку. Затем ведро поставила в раковину и 30 минут держим под холодной проточной воде, для того чтобы исследуемый материал хорошо промыть от формалина и его запаха. Сверху на ведро с кассетами ложем сито, так чтобы они не вылезли. После того как прошло 30 минут я аккуратно слила воду с ведра.

**День 9 (21.05.18)**

Принимала материал. Записывала в тетрадь, сколько принесли баночек и считала общее количество направлений к этим баночкам.

**День 10 (22.05.18)**

Заливала кусочки материала в парафин. Подождала, когда они застынут и затем обрезала аккуратно лишний парафин, так чтобы был квадрат. Обрезают лишний парафин для того чтобы срезы при резки на микротоме были ровными и аккуратными.



**День 11 (23.05.18)**

Регистрировала на компьютере направления, а затем приступила к вырезке материала. Я сложила кусочки по кассетам и записывала на бумажке номер, который был дан в направление и общее количество кусочков в кассете. Также я записывала номер и запас материала в специальной тетрадке.



**День 12 (24.05.18)**

Заливала кусочки исследуемого материала парафином.



После того как закончила работу с парафином я выключила баню, затем аккуратно беру кружку с парафином и убираю его в термостат, чтобы он не застыл.



**День 13 (25.05.18)**

**Приготовление парафиновых срезов.**

Блок фиксируют в объектодержателе так, чтобы длинная ось блока располагалась вдоль длинной оси микротома, а поверхность блока горизонтальной. Очень важна правильная установка ножа. Оптимальным углом наклона ножа считается такой, когда плоскость фасетки совпадает с плоскостью среза. На практике угол наклона ножа обычно несколько больше оптимального. Если угол наклона ножа слишком велик, материал будет крошиться, если слишком мал, нож будет 1-2 раза проскальзывать над блоком.

Парафиновые блоки режут прямым ножом. При резке парафиновых блоков нож устанавливают перпендикулярно оси микротома или слегка под углом. И в последнем случае нельзя получить серийных срезов, но зато очень плотные и трудно режущиеся объекты режутся легче.

Когда нож установлен, к нему осторожно подводят блокодержатель с блоком и одновременно придвигают нож к блоку. Подачу объектодержателя осуществляют с помощью кремальеры, расположенной в основании объектодержателя, либо рукой, толкая санки объектодержателя вдоль наклонных рельсов. Когда блок и нож сближены, проверяют горизонтальность верхней поверхности блока, которая не должна доходить до лезвия ножа на 0,5-1 мм. После этого устанавливают микрометрическую шкалу на получение толстых срезов (30 мкм) и движением салазок ножа начинают подавать блок вверх до тех пор, пока не начинают получаться первые полные срезы, затем микрометрическую шкалу следует установить на необходимую толщину срезов. Парафиновые срезы диаметром 7-10 мкм.



Парафиновые срезы режут сухим ножом. Полученные парафиновые срезы осторожно, не прикасаясь к режущему краю ножа, снимают влажной кисточкой или препаровальной иглой и помещают в чашку с теплой водой или сразу наклеивают на предметное стекло.

Нагревательный столик, на котором высушивают гистологические срезы.



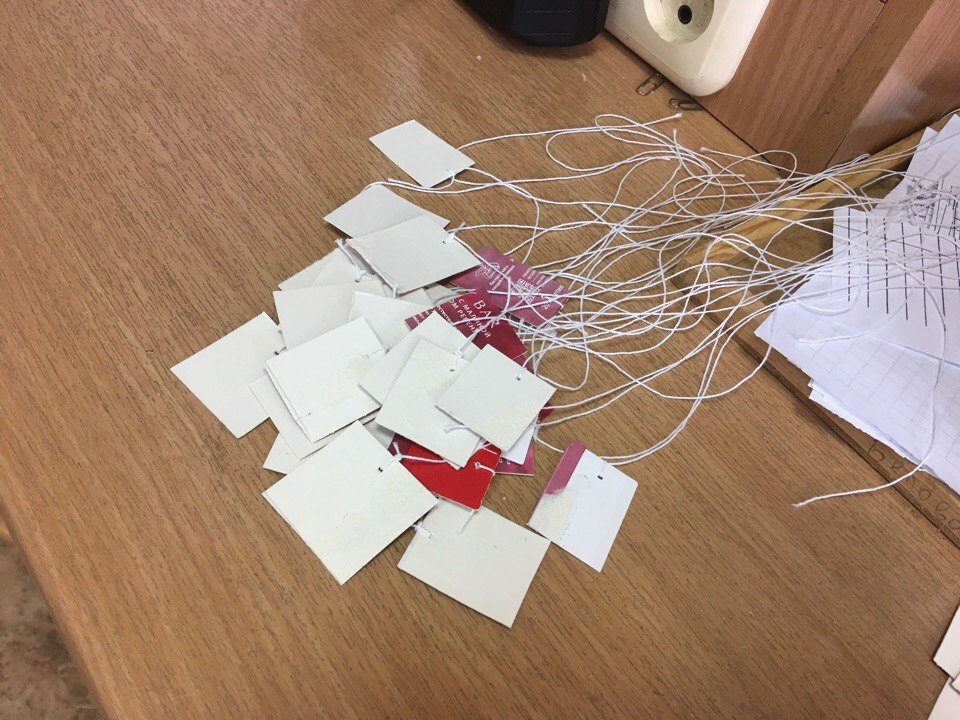
**День 14 (26.05.18)**

Собирала кассеты, а потом складывала их по фамилиям. Далее я разложила их в подписанные фамилиями коробочки, которые были указаны на кассетах.



**День 15 (28.05.18)**

Делала специальные бирки, которые используются во время вырезки, если остается запас исследуемого материала. Беру остатки исследуемого материала ложу его в марлю и завязываю специальными бирками. На бирках пишу число, месяц и год, а также номер, который дан в направлении.



После того как закончила делать бирки я приступила к заливки исследуемого материала в парафин.



**День 16 (29.05.18)**

**Окрашивание гистологических срезов.**

Основные красители:

В этой группе наибольшее значение имеют красители, приготовленные из гематоксилина.

**Гематоксилин**- является экстрактом кампешевого дерева, имеет вид бурого кристаллического порошка, хорошо растворимого в спирте и плохо в воде. Существует много способов приготовления гематоксилина, но суть их одна – его окисление.

Красящим веществом является не сам гематоксилин, а продукт его окисления – гематеин (C16H1406).

Гематоксилин Караци состав:

1. Вода дистиллированная – 400мл
2. Квасцы алюмо-калиевые – 25 г
3. Гематоксилин кристаллический – 0,5 г
4. Глицерин – 100 мл
5. Йодноватокислый калий – 0,03 г

Смесь готовят при комнатной температуре. Красящий раствор обладает большой устойчивостью, сохраняется около 10 лет; в первые недели после приготовления можно не фильтровать. Для предупреждения плесени в краску добавляют несколько кристалликов тимола.

Все гематоксилиновые красители окрашивают ядра в темно-синий (квасцевые) или черный (железный гематоксилин) цвет.

Кислые красители:

Из диффузных красок постоянное применение имеют эозин, кислый фуксин и пикриновая кислота.

**Эозин** – синтетический краситель, тетерабрампроизводное флуоресцина.

Выделяется в виде натриевой, калиевой или аммониевой соли. Различают много сортов эозина, из них наибольшее распространение имеют: эозин желтый (растворимый вводе), голубоватый (растворимый в спирте), эритрозин (растворимый только в спирте). Употребляются эозины в 0,25-0,5% водных или спиртовых растворах. Для приготовления спиртовых растворов можно пользоваться любыми сортами эозина и брать спирт различной крепости (от 40° до 70°); они окрашивают сильнее водных. Растворы эозина розового цвета, в такой же цвет они окрашивают и ткани. Сроки окрашивания весьма различны (от 5-10 секунд до 3-5 минут) и зависят от сорта, способа приготовления и процентного содержания красителя.

Все краски для гистологических работ готовят обязательно на дистиллированной воде.

**День 17 (30.05.18)**

**Окрашивание гистологических срезов.**

Основные красители:

В этой группе наибольшее значение имеют красители, приготовленные из гематоксилина.

Гематоксилин - является экстрактом кампешевого дерева, имеет вид бурого кристаллического порошка, хорошо растворимого в спирте и плохо в воде. Существует много способов приготовления гематоксилина, но суть их одна – его окисление.





Красящим веществом является не сам гематоксилин, а продукт его окисления – гематеин (C16H1406).

Гематоксилин Караци состав:

1. Вода дистиллированная – 400мл

2. Квасцы алюмо-калиевые – 25 г

3. Гематоксилин кристаллический – 0,5 г

4. Глицерин – 100 мл

5. Йодноватокислый калий – 0,03 г

Смесь готовят при комнатной температуре. Красящий раствор обладает большой устойчивостью, сохраняется около 10 лет; в первые недели после приготовления можно не фильтровать. Для предупреждения плесени в краску добавляют несколько кристалликов тимола.

Все гематоксилиновые красители окрашивают ядра в темно-синий (квасцевые) или черный (железный гематоксилин) цвет.

Кислые красители:

Из диффузных красок постоянное применение имеют эозин, кислый фуксин и пикриновая кислота.

Эозин – синтетический краситель, тетерабрампроизводное флуоресцина.

Выделяется в виде натриевой, калиевой или аммониевой соли. Различают много сортов эозина, из них наибольшее распространение имеют: эозин желтый (растворимый вводе), голубоватый (растворимый в спирте), эритрозин (растворимый только в спирте). Употребляются эозины в 0,25-0,5% водных или спиртовых растворах. Для приготовления спиртовых растворов можно пользоваться любыми сортами эозина и брать спирт различной крепости (от 40° до 70°); они окрашивают сильнее водных. Растворы эозина розового цвета, в такой же цвет они окрашивают и ткани. Сроки окрашивания весьма различны (от 5-10 секунд до 3-5 минут) и зависят от сорта, способа приготовления и процентного содержания красителя.

Все краски для гистологических работ готовят обязательно на дистиллированной воде.