Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно - Ясенецкого»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

**Дневник**

производственной практики

по модулю «Проведение лабораторных гистологических исследований»

 Королева Светлана Евгеньевна

ФИО

Место прохождения практики

 Фармацевтический колледж

(медицинская организация, отделение)

с « 22 » мая 20 20 г. по «3» июня 20 20 г.

Руководители практики:

Общий – Ф.И.О. (его должность) Догадаева Елена Григорьевна

Непосредственный – Ф.И.О. (его должность) Догадаева Елена Григорьевна

Методический – Ф.И.О. (его должность) Догадаева Елена Григорьевна

Красноярск, 2016

**Содержание**

1. Цели и задачи практики

2. Знания, умения, практический опыт, которыми должен овладеть студент после прохождения практики

3. Тематический план

4. График прохождения практики

5. Инструктаж по технике безопасности

6. Содержание и объем проведенной работы

7. Манипуляционный лист (Лист лабораторных / химических исследований)

8. Отчет (цифровой, текстовой)

**Цели и задачи практики:**

1. Закрепление в производственных условиях профессиональных умений и навыков по методам гистологических исследований.

2. Расширение и углубление теоретических знаний и практических умений по методам гистологических исследований.

3. Повышение профессиональной компетенции студентов и адаптации их на рабочем месте, проверка возможностей самостоятельной работы.

4. Воспитание трудовой дисциплины и профессиональной ответственности.

5. Изучение основных форм и методов работы в гистологических лабораториях.

**Программа практики.**

В результате прохождения практики студенты должны уметь самостоятельно:

1. Организовать рабочее место для проведения лабораторных гистологических исследований.

2. Подготовить лабораторную посуду, инструментарий и оборудование для анализов.

3. Приготовить растворы, реактивы, дезинфицирующие растворы.

4. Провести дезинфекцию биоматериала, отработанной посуды, стерилизацию инструментария и лабораторной посуды.

5. Провести прием, маркировку, регистрацию и хранение поступившего биоматериала.

6. Регистрировать проведенные исследования.

7. Вести учетно-отчетную документацию.

8. Пользоваться приборами в лаборатории.

9. Выполнять гистологические манипуляции по соответствующим методикам.

**По окончании практики студент должен**

**представить в колледж следующие документы:**

1. Дневник с оценкой за практику, заверенный подписью общего руководителя и печатью ККПАБ.

2. Характеристику, заверенную подписью руководителя практики и печатью ККПАБ.

3. Текстовый отчет по практике (положительные и отрицательные стороны практики, предложения по улучшению подготовки в колледже, организации и проведению практики).

4. Выполненную самостоятельную работу.

**В результате производственной практики обучающийся должен:**

**Приобрести практический опыт:**

- приготовления гистологических препаратов

**Освоить умения:**

- готовить материал, реактивы, лабораторную посуду и аппаратуру для гистологического исследования;

- проводить гистологическую обработку тканей и готовить микропрепараты для исследований;

- оценивать качество приготовленных гистологических препаратов;

- архивировать оставшийся от исследования материал;

- оформлять учетно-отчетную документацию;

- проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**Знать:**

- задачи, структуру, оборудование, правила работы и техники безопасности в патогистологической лаборатории;

- правила взятия, обработки и архивирования материала для гистологического исследования;

- критерии качества гистологических препаратов;

- морфофункциональную характеристику органов и тканей человека.

**Тематический план**

**4/6 семестр**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | **Наименование разделов и тем практики**  | **Всего часов**  |
| **4/6 семестр**  | **108** |
| 1  | **Ознакомление с правилами работы в ККПАБ:** - изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в ККПАБ. - ознакомление с правилами работы в гистологических лабораториях.  | 6 |
| 2 | **Подготовка материала к гистологическим исследованиям:** - прием, маркировка, регистрация биоматериала. - устройство микроскопов и техника микроскопирования. -устройство санного микротома и микротомных ножей.  | 12 |
| 3 | **Организация рабочего места:** - приготовление реактивов, подготовка оборудования, посуды для исследования  | 6 |
| 4 | **Техника приготовления гистологических препаратов:** - приготовление гистологических срезов; - уплотнение материала; - обезвоживание; - фиксация; - техника окрашивания срезов: а) предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской. -предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской. б) проведение окрашивания срезов, наклеенных на предметные стекла и свободноплавающих срезов. в) просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы) ; - обработка биопсийного материала; - приготовление препаратов для электронно – микроскопического исследования  | 66 |
| 5 | **Регистрация результатов исследования.**  | 6 |
| 6 | **Выполнение мер санитарно-эпидемиологического режима в ККПАБ :** - проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; - утилизация отработанного материала.  | 6 |
| **Вид промежуточной аттестации**  | Дифференцированный зачет  | 6 |
| **Итого** | **108** |

**График прохождения практики.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ п/п** | **Дата** | **Часы** | **Оценка** | **Подпись руководителя.** |
| 1 | 21. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 2 | 22. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 3 | 23. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 4 | 25. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 5 | 26. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 6 | 27. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 7 | 28. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 8 | 29. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 9 | 30. 05. 2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 10 | 01.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 11 | 02.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 12 | 03.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 13 | 04.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 14 | 05.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 15 | 06.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 16 | 08.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 17 | 09.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |
| 18 | 10.06.2020 г. | 6 ч. |  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Исследования | Количество исследований по дням практики | Итог |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |  |
| Изучение нормативных документов |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Прием, маркировка, регистрация биоматериала |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Организация рабочего места |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Приготовление срезов |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Уплотнение материала |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Обезвоживание |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Фиксация |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Окрашивание срезов |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Обработка биопсийного материала |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Приготовление препаратов для электронно – микроскопического исследования |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Микроскопия |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Регистрация результатов исследования |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Утилизация отработанного материала |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**День 1 (21.05.2020 г)**

**Тема:** «Организация рабочего места лаборанта гистолога, прием, маркировка, регистрация биоматериала»

**Рабочий стол**

 При отсутствии специального стола может быть приспособлен любой стол (желательно с ящиками) с площадью рабочей поверхности не менее 60 \*120 см.

Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из какого - либо влагоустойчивого материала. Однако участок стола, предназначенный для непосредственной работы по приготовлению препаратов, в любом случае необходимо накрыть стеклом и расположить под ним небольшие (9\*12 см) листы белой или черной бумаги. Этим создаете» соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными (белый лист) и не окрашенными (черный лист) объектами. Рекомендуется также на оба листа нанести контуры предметного стекла с обозначением места расположения и размеров покровного стекла. Этот простой прием позволяем рационально разместить на предметном стекле срезы в процессе их заключения.

Для того чтобы удобнее расположить необходимое оборудование, следует иметь двухъярусную полку, для реактивов,, растворов и посуды, которая устанавливается либо перед работающим (вдоль заднего края стола), либо сбоку в зависимости от расположения стола относительно источника света.

**Необходимая лабораторная посуда**

 - широкогорлые банки с притертыми пробками различной вместимости от 50 до 200 мл - используют для составления гистологических батарей, предназначенных для подготовки кусочков тканей к заливке различными средами. Более крупные банки применяют для фиксации и хранения кусочков тканей в фиксирующих жидкостях, обработки предметных стекол, 6приготовления нейтрального формалина и пр. Вместо банок с притертыми пробками можно использовать небольшие хозяйственные банки с жестяными завинчивающимися крышками разного объема.

 - бюксы - небольшие круглые стеклянные стаканчики различного диаметра и высоты со шлифованными крышками.

 - биологические стаканчики - круглые, овальные или четырехугольные (как и высокие бюксы) применяют для проводки гистологических срезов, монтированных на предметных стеклах. Для придания устойчивости и обеспечения порядка в расстановке их помещают в специальные стойки, изготовленные из дерева или пластмассы, по нескольку жук в ряд зависимости от методики обработки.

 - чашки Петри - широкие, плоские стеклянные чашки с крышками-пригодны для различных манипуляций (окраска свободно плавающих и наклеенных на предметные стекла срезов, использование в качестве подставок под бюксы и т.д.).

 - мерная посуда - цилиндры и мензурки различной емкости (от 10 до 250-500 мл) воронки различных размеров.

 - химические стаканчики - круглые стеклянные стаканчики без крышек вместимостью 50-100 мл - находят широкое применение при проведении химических реакций, окраски срезов наклеенных на стекла и т.д.

 - колбы (плоскодонные) вместимостью от 50 до 2 л. Малые колбы применяют для приготовления и хранения растворов различных красителей, большие - под дистиллированную воду и прочие жидкости, расходуемые в больших количествах.

 - пипетки обычные (предназначенные для закапывания лекарств) используют для накалывания на срезы красителей и различных жидкостей, градуированные (вместимостью 0,1-100 мл) применяют для отмеривания малых количеств различных жидкостей. Можно использовать в настоящее время широко используемые автоматические пипетки различной вместительности.

 - предметные стекла - прямоугольные пластины размером 76\*25мм толщиной 1 мм. предназначенные для размещения гистологических срезов, расположенных на предметных стеклах. Размеры предметных стекол выбирают в зависимости от площади объекта.

**Инструменты**

 Инструменты, используемые в гистологической лаборатории, включает пинцеты, скальпели, кровоостанавливающие зажимы, корцанги, шпатели, препаровальные иглы - прямые и изогнутые, металлические и стеклянные. Стеклянные иглы необходимы при импрегнации серебром, когда металлическими иглами пользоваться нельзя, также необходимо иметь спиртовку, волосяную кисточку для снятия срезов с микротомного ножа, фильтровальную бумагу, иголки» нитки, плотную бумагу для этикетирования материала, лейкопластырь и карандаш по стеклу.

**Правила взятия гистологического материала**

 При микроскопическом исследовании тканей и органов большое значение имеет техника взятия материала. Соблюдение приведенных правил взятия материала позволит уменьшить количество артефактов и ошибок при гистологическом исследовании.

1. Кусочки органов следует вырезать острым ножом или бритвой.

Пользоваться ножницами во избежание размятия тканей не рекомендуется. Нельзя сдавливать кусочки, скоблить или протирать их поверхность, особенно слизистую и серозную оболочки.

2. Кусочки вырезают толщиной 0,5-1 см, длина и ширина может быть различной (обычно 1- 1,5 см) с таким расчетом, чтобы получаемый срез поместился под стандартное покровное стекло. Ввиду медленного проникновения фиксатора в глубину ткани взятие на исследование более толстых кусочков не рекомендуется.

3. Кусочки сразу же помещают в фиксирующую жидкость. Недопустимо обмывание кусочков водой перед фиксацией.

**Маркировка**

• Четкая, хорошо читаемая печать;

• Стойкость маркировки к множественным смывкам и длительному воздействию агрессивных растворителей (ксилол, толуол, спирт, гексан, ацетон и др.);

• Надежное сцепление этикетки с поверхностью из пластика и стекла;

• Поверхность этикетки не должна окрашиваться при обработке образца красящим веществом;

• Долговечность - маркировка должна сохранять читаемость в течение нескольких лет.

**День 2 (22.05.2020 г)**

**Тема:** «Техника приготовления гистологических и цитологических препаратов: приготовление гистологических срезов; приготовление цитологических препаратов»

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

ПРАВИЛА ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ:

Взятие материала для цитологических исследований проводит врач (с помощью медицинской сестры): врачи-клиницисты разного профиля (гинекологи, хирурги, онкологи, эндокринологи, врачи- эндоскописты).

 Время взятия материала и условия подготовки пациентов зависят от вида материала и способа его получения.

ВИДЫ ИССЛЕДУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ:

 **Эксфолиативный материал:**

- отделяемое различных органов (молочная железа, влагалище, мочевой пузырь и др.);

- соскобы и отделяемое с поверхности эрозий, ран, язв, свищей;

-соскобы с шейки матки и цервикального канала, аспираты из полости матки;

-секреты желез, экскреты, мокрота, транссудаты, экссудаты, промывные воды и т.д.

 **Пункционный материал:**

- пунктаты, полученные тонкой иглой (тонкоигольная биопсия) из опухолей, предопухолевых и опухолеподобных образований и уплотнений различной локализации (кожа, молочная железа, лёгкие, средостение, печень, почки, забрюшинные образования, щитовидная железа, предстательная железа, яичко, яичники, лимфатические узлы, миндалины, слюнные железы, мягкие ткани, кости и др.).

**Биопсийный и операционный материал:**

- материал, полученный при проведении хирургических вмешательств (мазки-отпечатки, соскобы со свежего разреза удаленной ткани, жидкость);

- материал, полученный при проведении эндоскопического исследования (ларингоскопии, бронхоскопии, эзофагоскопии, гастроскопии, дуоденоскопии, лапароскопии, колоноскопии и т. д.).

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ:

Общие положения:

- клеточный материал наносят сухим инструментом тонким слоем в продольном направлении (или готовят отпечатки с ткани) на чистые, обезжиренные, сухие предметные стёкла (одноразовые).

- ёмкости для доставки материала: пробирки, чашки Петри и т. д. должны быть одноразовыми и чистыми. Подсушивание цитологических мазков проводят при комнатной температуре на воздухе.

- если методика окрашивания (По Паниколау и др.) требует влажной фиксации мазка, то сразу после получения материала мазок обрабатывают аэрозолем для фиксации или капельным фиксатором или помещают на 10 минут в 96 % спирт, после чего препарат высушивают на воздухе.

- цитологические препараты с тканевого кусочка (отпечатки) готовят до его обработки формалином.

- направляемый на цитологическое исследование материал нельзя делить на части и рассылать в разные лаборатории, т.к. характерные изменения могут быть в одной части материала и не быть в другой.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСФОЛИАТИВНОГО МАТЕРИАЛА:

- мазки из отделяемого готовятся из клеточных элементов, которые легко слущиваются с поверхности слизистых и серозных оболочек или спонтанно попадают в различные выделения (выпоты, секреты, мокроту, патологические выделения из молочной железы, плевральный экссудат, мочу).

- для приготовления препарата капля отделяемого (из молочной железы, свищей и др.) наносится на стекло и готовится мазок.

- мазки - отпечатки: к месту поражения прикладывается предметное стекло, на котором остаётся некоторое количество клеточных элементов и слизистого отделяемого:

- с места выделения (сосок молочной железы, выходное отверстие свища):

- со слизистой оболочки, изъязвлённой поверхности слизистых и кожных покровов;

- материал с поражённого участка можно брать также с помощью ватного тампона и наносить на предметное стекло в виде отпечатков.

- мазки-отпечатки из соскоба готовятся с помощью шпателя, края предметного стекла, скальпеля: соскобы делаются осторожно с легко доступных очагов поражения, обилие слизи и некротических масс в биологическом материале препятствуют правильному приготовлению мазка, поэтому гнойные корки и некротические массы должны быть удалены.

- цитологические препараты из осадка доставленной в лаборатории жидкости серозных полостей и содержимого кист получают путём пункции плевральной, перикардиальной, брюшной полости и кист:

- в жидкость добавляют консервант, чтобы предотвратить свёртывание (1 г лимоннокислого натрия на 1 л жидкости), тщательно перемешивают.

- в лабораторию доставляют всю полученную жидкость для исследования.

- если количество жидкости слишком велико (несколько литров), то жидкость отстаивают (около часа), сливают верхний слой, а отстоявшийся нижний (в пределах 1л) доставляют в лабораторию; специальный контейнер для таких количеств жидкости можно запросить в лаборатории.

ПОЛУЧЕНИЕ ПУНКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА:

- пункцию проводит врач, как правило, под контролем ультразвукового исследования, реже под контролем рентгеновского исследования.

- для получения полноценного материала для цитологического исследования при проведении диагностической пункции необходимо соблюдать ряд правил:

- пункцию проводят с соблюдением правил асептики и антисептики;

- нельзя пунктировать опухоль при подозрении на меланому; рекомендуется предварительно провести исследование крови на Белок S-100.

- перед проведением пункции опухоль тщательно пальпируют, определяют её подвижность, связь с окружающими тканями и возможность оптимальной фиксации;

- игла и шприц для пункции должны быть абсолютно СУХИМИ;

- Не следует проводить обследуемому анестезию пунктируемого образования (сама пункция не более болезненна, чем прокол иглой для анестезии, кроме того, применение новокаина может вызвать изменение клеточных элементов);

- мандреном, как правило, не пользуются, так как используемые для диагностических пункций иглы имеют очень маленький диаметр и косой срез на конце, игла легко продвигается через ткани, расположенные над опухолью (кожу, подкожную клетчатку, мышцы), расслаивая их, закупорка иглы происходит очень редко. Однако при пункции богато васкуляризированных образований (щитовидная железа, сосудистые опухоли, кости и др.) необходимо использовать иглу с мандреном, последний извлекается после введения иглы в исследуемое образование;

- ПУНКЦИЮ различных образований, в том числе опухолей производят тонкой иглой (наружный диаметр 0, 6-0, 7 мм), которая присоединяется к шприцу 20 мл.

**Методика проведения пункции тонкой иглой**

 Опухоль фиксируют пальцами левой руки. Иглу без шприца (или с присоединённым шприцем с опущенным поршнем) вводят перпендикулярно через кожу в исследуемое образование. По достижении очага поражения осторожно пальпируют ткань вокруг введённой иглы, определяя правильность прокола; при небольшом подкожном узле можно несколько наклонить иглу, при этом опухоль на игле сместится, что ощущается пальцами и подтверждает правильное положение иглы.

Не рекомендуется производить вращательные движения иглой, так как это наносит лишнюю травму и не приводит к получению более полноценного материала. После этого присоединяют шприц с опущенным поршнем (если он не был присоединен сразу) и делают 2-3 резких насасывающих движения, снимая шприц с иглы после каждого подъёма поршня. По окончании взятия шприц необходимо снять, иглу извлекают без шприца, что позволяет сохранить материал; для цитологического исследования достаточно материала попавшего в просвет иглы.

 Содержимое шприца выдувается на предметное стекло при помощи шприца, который наполняется воздухом и вновь соединяется с иглой. Содержимое размазывается по стеклу другим стеклом или ребром иглы. Если при проколе опухоли появляется жидкость, то под иглу подставляют пробирку и собирают жидкость. Если жидкость не стекает, можно использовать шприц, осторожно оттягивая поршень и, набирая жидкость в шприц, после чего шприц снимают и жидкость сливают в пробирку. После удаления жидкости иглу вводят в более плотную ткань пунктируемого образования и получают пунктат в просвете иглы.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОПСИЙНОГО И ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА:

- цитологические препараты (отпечатки и соскобы) можно делать из материала, полученного при биопсии или хирургической операции:

- отпечатки выполняются путём прикладывания стекла к биопсированному кусочку или разрезу удалённой опухоли;

- разрез опухоли или лимфатического узла необходимо проводить сухим скальпелем, чтобы избежать разрушения клеток водой;

- если консистенция ткани плотная (костная, хрящевая) и не позволяет сделать отпечатки, производят соскоб с поверхности свежего разреза опухоли (путём лёгкого соскабливания предметным стеклом или скальпелем).

- при проведении эндоскопического обследования материал для цитологического исследования берут с помощью специальных приспособлений;

- аспираты промывных вод - с помощью отсасывающего устройства;

- при бронхоскопии - для приготовления мазков из бронхоальвеолярных лаважей используется технология цитоцентрифугирования;

- мазки-отпечатки из материала щипковых биопсий, браш-биоптаты. пунктаты и др.

В случае если материалом для цитологии является жидкость, её необходимо направить в лабораторию в стерильном контейнере подходящего размера. Цитоцентрифугирование (наслаивание клеток из жидкости на стекло) проводится в лаборатории «Дитрикс Медикал».

ПРАВИЛА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ (МАЗКОВ) ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ:

 Необходимой предпосылкой для точной оценки морфологических особенностей клеток в мазке является правильно сделанный, качественно фиксированный, хорошо окрашенный и методологически корректно изученный мазок, поступающий в лабораторию в сопровождении необходимых клинико-инструментальных и анамнестических данных. Невыполнение этих условий ведёт к неправильному распределению клеток ткани, не-полному выявлению их морфологических особенностей, «пропуску» важной диагностической информации на предметном стекле или отсутствию корригирующей клинической информации и, тем самым, к ошибочной оценке цитологической картины, а значит к неполноценному или ошибочному диагнозу.

 Если мазки были приготовлены вне лаборатории, то в соответствии с теми же требованиями оценивается их макроскопический вид.

**Техника приготовления мазков**

Полученное количество материала не всегда определяет возможности диагностики, иногда очень малое количество материала является достаточным для постановки диагноза. Наличие большого количества крови часто является помехой. При её наличии мазки необходимо делать как можно скорее, иначе наступает свертывание и из свернувшегося сгустка очень трудно сделать мазки и провести исследование. Материал наносят на стекло и очень аккуратно делают мазки, т. к. клетки очень ранимы, а наличие большого количества разрушенных клеток мешает правильной диагностике. Из жидких пунктатов мазки готовят подобно мазкам крови, если полученная масса плотная или комковатая, то помимо мазков можно приготовить и отпечатки на стекле.

Метод отпечатков имеет определенные преимущества:

 Во-первых клетки подвергаются гораздо меньшему травматизму.

 Во-вторых есть возможность расположения клеток пластами, что помогает при описании цитологического препарата характеризовать и соотношение клеток между собой.

 В-третьих, если материал богат кровью, его необходимо нанести на стекло и тогда выбирать оттуда "белые крупинки" и ими делать мазки.

Метод отпечатков применим при использовании цитологического метода во время операционного вмешательства, а так же получении биопсии. Этот метод может быть использован как самостоятельно, так и параллельно с гистологическим анализом.

В этих случаях помимо пункций проводят получение отпечатков с удаленных или обнаженных органов, с помощью прикосновения стекла предметного к исследуемой ткани. Так же можно готовить препараты при получении материала методом соскоба.

Жидкости, полученные при пункции, тут же центрифугируют, далее сливают верхний слой из центрифуги, а из осадка делают мазки, которые и подвергают цитологическому исследованию. В некоторых случаях приготовленные препараты можно просмотреть под микроскопом, однако диагностику патологии необходимо проводить только по окрашенному препарату.

**Правильно приготовленный мазок из нормальной или патологически измененной ткани должен отвечать следующим условиям:**

1. Мазок должен начинаться на расстоянии 1см от узкого края предметного стекла и заканчиваться примерно в 1,5 см от другого края предметного стекла. Мазок не должен достигать длинного края стекла. Между мазком и длинным краем предметного стекла должно оставаться расстояние примерно 0.3 см.

2. Хороший мазок должен быть максимально тонким (максимально приближающимся к однослойному), равномерной толщины (не волнообразным) на всём протяжении.

3. Мазок из осадка жидкого материала (жидкость из серозной полости, смыв из различных органов, содержимое кистозной полости и т.п.) должен заканчиваться у одного из узких краёв предметного стекла в виде следа, оставленного как бы тонкой щёткой.

4. Клетки в мазке должны быть равномерно распределены. Все участки мазка должны хорошо просматриваться; не должно быть «толстых участков», содержащих непросматриваемые (плохо просматриваемые) скопления или комплексы клеток.

ПРАВИЛА ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ЛАБОРАТОРИЮ.

1. Флаконы с материалом и стекла-мазки должны иметь идентификацию (маркировку): на них должны быть чётко нанесены код или фамилия больного, идентичные коду и фамилии в бланке направления материала для цитологического исследования.

Для приготовления цитологических препаратов предпочтительнее использовать предметные стёкла со шлифованным краем, которые легко маркируются.

2. Цитологический материал доставляют в лабораторию в ближайшие сроки после его взятия. Особенно это относится к жидкостям, мокроте, содержимому кист и любому кровянистому материалу.

3. Полученный материал доставляют в лабораторию с бланком-направлением, в котором должны быть представлены данные обследуемого пациента, диагноз, проведённая терапия, точно должно быть указано место участка, откуда был взят материал, и способ его получения.

4. Сотрудник внутри лаборатории, который принимает материал, должен проверить маркировку препаратов, пробирок и т.д., оформление направления, отметить характер и количество биоматериала, число присланных мазков.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ**

**Техника приготовления замороженных срезов.**

Замороженные срезы получают с помощью замораживающих микротомов или в криостате. Замораживающий микротом снабжен замораживающим столиком, на котором замораживается объект. В столике имеются камера и приспособление для подачи в камеру углекислоты, соединенное специальным шлангом с баллоном, в котором находится углекислота. Баллон закрепляется вверх дном в вертикальном положении на специальной подставке. Вместо углекислотной установки для замораживания тканей может быть использован термоэлектрический охлаждающий столик (ТОС). Более быстро и лучшего качества срезы можно получить в криостате. Криостат представляет собой холодильник, в котором поддерживается температура минус 5°С - 40°С. Чаще всего рабочей температурой является температура минус 14°С – минус 20°С. В холодильник вмонтированы микротом (криотом), имеется освещение. В передней стенке криостата имеется окошечко, в боковых стенках – отверстия с рукавами для рук оператора. Микротом в криостате обычно ротационный, ткани примораживаются к латунным держателям, держатель фиксируется на специальном стержне.

Микротомный нож закреплен неподвижно, а объект при резке подводится к ножу. Существуют различные методы дальнейшей обработки срезов:

1) срез снимают на теплое (с температурой, равной комнатной) или холодное (с температурой, равной температуре криостата) покровное или предметное стекло и фиксируют в момент таяния;

2) срез снимают на теплое или холодное покровное или предметное стекло, дают ему оттаять и подсушивают на воздухе, после чего он может быть фиксирован или не фиксирован в зависимости от дальнейшего исследования;

3) срез переносят в теплый или холодный раствор реактива (инкубационной среды при гистохимическом исследовании ферментов);

4) срез переносят в банку с теплым или холодным фиксатором;

5) срез подвергают лиофильной сушке.

**Наклейка целлоидиновых срезов на предметное стекло**

Хорошо моют предметные стекла, обрабатывают их спиртом и наносят тонкий слой белка с глицерином. В отличие от Парафиновых срезов при наклейке целлоидиновых нужно смазывать предметные стекла смесью белка с глицерином несколько обильнее и, как правило, не свертывать нагреванием. Стекла покрывают белком с глицерином перед самым наклеиванием срезов. Вначале срезы перед наклейкой помещают в чашку с 50—70° спиртом и на предметные стекла берут их именно отсюда, так как вода смывает смесь белка с глицерином. Свертывания белка в 50—70° Спирте не происходит. Свертывания белка в 50—70° спирте не происходит. Белок свертывается лишь в 96° или абсолютном спирте. Извлекают срез из 50—70° спирта на подготовленное предметное стекло (сразу на середину), тщательно расправляют его, удаляют фильтровальной бумагой вокруг среза избыток спирта и сильно прижимают сухой гладкой фильтровальной бумагой, сложенной в 3—4 слоя. Обрабатывают 96° спиртом в течение 3—5 минут и отжимают фильтровальной бумагой. 4; Снимают фильтровальную бумагу и сразу наливают гвоздичное масло.

**Изготовление срезов и их наклейка**

Для изготовления срезов из парафиновых блоков обычно используются два типа микротомов - санные и ротационные. В нашей стране более распространены приборы с ручным приводом (существуют и автоматизированные микротомы). В настоящее время отечественная промышленность не производит микротомов, отвечающих высоким требованиям, предъявляемым к приборам подобного класса. Наиболее качественные приборы изготавливаются зарубежными фирмами, одной из которых является немецкая фирма PFM. В большинстве лабораторий отдают предпочтение санным микротомам. Они проще устроены, просты в работе и обслуживании и позволяют изготавливать срезы, как с парафиновых, так и с целлоидиновых блоков. Кроме того, санный микротом легко дооснащается замораживающим столиком и приспосабливается для изготовления срезов замороженных тканей.

Ротационные микротомы используют главным образом при необходимости получения тонких (1-3 мкм) срезов и для изготовления серий срезов. При планировании иммуноцитохимических исследований использовать целлоидин - парафиновые методы заливки не рекомендуется из-за частого развития неспецифической фоновой реакции. Ее можно избежать только предварительно удалив из срезов целлоидин. Увеличение времени пребывания в этой среде не сказывается отрицательно на качестве дальнейшей проводки и заливки. На санном микротоме с ручным приводом невозможно стабильное получение парафиновых срезов тоньше 4 мкм, даже при использовании специальных сортов парафина. Как в санных, так и в ротационных микротомах для изготовления срезов могут быть использованы многоразовые ножи (которые можно точить и править) и специальные одноразовые лезвия. При изготовлении срезов их следует снимать с микротомного ножа при помощи кисточки и препаровальной иглы таким образом, чтобы не коснуться режущей кромки ножа. По окончании работы нож следует тщательно очистить от остатков срезов и кусочков прилипшего парафина при помощи тряпочки, смоченной бензином, петролейным эфиром или ксилолом. При загрязнении режущей кромки ее следует промыть бензином, а не вытирать, чтобы не повредить лезвие. Неаккуратное обращение с многоразовым ножом сокращает срок его службы. Следует помнить, что заводская заточка ножа всегда лучше, чем проведенная повторно. Срезы с ножа обычно собирают на дистиллированную воду (реже наклеивают на предметные стекла сухим способом). При снятии срезов на воду для обеспечения хорошего их расправления воду подогревают до 37°-40°С (так, чтобы срезы расправились без подплавления парафина). Расправленные срезы вылавливают на приготовленные предметные стекла. Можно снимать срезы и на дистиллированную воду, помещенную на предметное стекло (обычно по 2-3 капли воды на стекло). В этом случае расправления срезов добиваются, нагревая стекла с плавающими на воде срезами на нагревательном столике или над пламенем спиртовки. В последнем случае следует быть очень внимательным, чтобы не допустить перегрева и расплавления парафина, из-за чего срез может разорваться. Дальнейший перегрев может привести к нарушению тинкториальных свойств ткани. После расправления срезов на стекле излишек воды (вокруг срезов) аккуратно удаляют фильтровальной бумагой и помещают папки с предметными стеклами в термостат (37°С) на ночь. После этого срезы могут быть окрашены.

**Подготовка предметных стекол**

Перед наклеиванием срезов предметные стекла должны быть подготовлены для того, чтобы в ходе дальнейшей обработки срезы не отклеивались. Не требуют специальной подготовки только предметные стекла, обработанные в заводских условиях специальными адгезивами — поли - L-лизином и аминоалкилсиланом. Такие стекла выпускаются рядом зарубежных фирм (Sigma, Dako, Shandon, Menzel и др.). О наличии адгезивного покрытия можно судить по надписи, имеющейся на упаковке предметных стекол. Подготовка предметных стекол к работе состоит из двух этапов — очистки (обезжиривания) и нанесения адгезивного покрытия. В настоящее время российскими производителями предметные стекла, не нуждающиеся в обезжиривании, не выпускаются. На упаковках стекол импортного производства, не нуждающихся в очистке и обезжиривании, должна быть маркировка "рге cleaned".

**Очистка и обезжиривание обычных предметных стекол.**

Сначала предметные стекла тщательно промывают в теплой мыльной воде, прополаскивают в чистой водопроводной (а лучше дистиллированной) воде и насухо протирают неворсистой тканью (лучше льняной). Такие стекла можно завернуть в чистую бумагу и использовать по мере необходимости. Перед работой необходимое количество предметных стекол погружают в эксикатор (или банку с притертой пробкой) с жидкостью Никифорова (этанол-эфир 1:1) или 96% этанолом. В жидкости Никифорова происходит окончательное обезжиривание стекол. Если предметные стекла, поступающие в лабораторию достаточно чистые, можно ограничиться только обезжириванием их в жидкости Никифорова или этаноле. Для проверки качества очистки и обезжиривания на извлеченное из жидкости Никифорова и тщательно протертое сухой тканью предметное стекло нужно поместить каплю дистиллированной воды. Если вода растекается по поверхности стекла, то такие стекла можно использовать, если вода собирается в каплю — очистка стекла недостаточная или свойства поверхности стекла таковы, что срезы могут отклеиваться, даже при последующей обработке адгезивом. Следует отметить, что чем толще срезы, тем они более склонны отклеиваться при дальнейшей обработке. Срезы могут отклеиваться при высокой температуре растворов (что может иметь место в иммуноцитохимических исследованиях и при постановке гибридизации in situ). В щелочных ваннах срезы отклеиваются чаще, чем в нейтральных и кислых.

**Обработка адгезивными средами.**

Адгезивные среды наносятся только на очищенные и обезжиренные предметные стекла. Среди методов увеличения адгезивных свойств предметных стекол следует остановиться на двух, наиболее распространенных. Это - обработка яичным белком с глицерином и обработка желатиной. Лучшую адгезию, чем при использовании этих двух способов, дает применение полилизина и аминоалкилсилана, однако в лабораторных условиях нанесение этих покрытий бывает не всегда успешным, поэтому, при необходимости применения таких адгезивов, лучше заказать импортные предметные стекла, обработанные в заводских условиях.

**Обработка белком с глицерином.**

Берут свежий яичный белок (без примеси желтка), взбивают его шпателем до состояния пены и выливают на большой широкопористый фильтр, смоченный предварительно дистиллированной водой. Фильтрация продолжается около 24 ч. К профильтрованному белку прибавляют равный объем глицерина, размешивают и добавляют кусочек камфары или тимола для предупреждения загнивания. Камфору (или тимол) можно добавить и в белок во время взбивания. Приготовленный белок с глицерином хорошо сохраняется в бытовом холодильнике (несколько месяцев). Обработка обезжиренных предметных стекол белком с глицерином производится непосредственно перед изготовлением срезов следующим образом. Предметные стекла извлекаются из этанола или жидкости Никифорова поочередно, тщательно протираются сухой тканью и раскладываются в необходимом количестве на папках. На каждое предметное стекло кончиком препаровальной иглы или тонкой стеклянной палочкой наносится маленькая капелька белка с глицерином. Подушечкой пальца (сухой) лаборант тщательно растирает капельку по поверхности стекла до ощущения притирания (более высокого сопротивления движению). После этого оставляют стекла в сухом помещении для подсыхания (защитив от пыли), ставят папки на непродолжительное время (15-20 мин) в термостат или проводят каждое стекло над пламенем спиртовки, добиваясь его нагревания до 50°-60°С, после чего стекла готовы для наклейки срезов.

**Обработка желатином.**

Растворяют 2,5 г желатина в 500 мл дистиллированной воды, нагревая раствор до 50°С при постоянном помешивании. После растворения желатина добавляют 0,25 г хромокалиевых квасцов и хорошо перемешивают раствор. Охлаждают раствор до комнатной температуры и хранят при 4°С. Перед использованием раствор нагревают до 60°С и фильтруют. Помещают в раствор очищенные предметные стекла, вынимают и сушат на подставке при 60°С не менее часа. После охлаждения стекла можно использовать или хранить в коробках (для защиты от пыли).

**Подготовка срезов к окрашиванию и последующая обработка.**

Поскольку большинство красителей не проникают в срезы, пропитанные парафином и являются водо - или спирторастворимыми веществами, парафин перед окраской препаратов должен быть удален. Этого достигают в ходе процедуры депарафинирования и регидратации. В качестве растворителя парафина обычно используют орто – ксилол. Для регидратации применяют спирты (этанол) нисходящей крепости. При постановке иммуноцитохимических реакций некоторые фирмы (например Sigma) в своих протоколах рекомендуют перед депарафинированием прогреть предметные стекла в термостате (56 °С). Проводить депарафинирование и регидратацию срезов, наливая ксилол и спирт непосредственно на предметное стекло, как это рекомендует Г.А.Меркулов, не следует, чтобы избежать токсического воздействия паров ксилола. Целесообразно использовать высокие цилиндрические стаканчики с притертыми крышками. Для депарафинирования и регидратации достаточно пяти стаканчиков. В первые два наливают орто - ксилол. Затем следуют две порции 96%-го этанола и 80%-го этанол. В каждой порции ксилола предметные стекла следует оставить на 3-5 минут. В спирты стекла следует помещать на 2-3 минуты. При перекладывании стекол следует аккуратно промокать их торцевую часть о фильтровальную бумагу, чтобы не загрязнять последующие растворы. Депарафинировать и регидратировать предметные стекла, сложенные по два (срезами наружу) не следует из-за опасности занесения ксилола, который может остаться между стеклами, в спирты и воду. Из 80%-го спирта предметные стекла переносят в дистиллированную воду на 5 (или более) минут. На этом регидратация срезов завершается и можно приступать к окраске.

**Дегидратация, просветление и заключение срезов после окраски.**

После завершения окраски необходимо получить препарат, пригодный для микроскопического исследования. С этой целью используют застывающие прозрачные среды, которые помещают на окрашенный срез и накрывают чистым покровным стеклом длинной 22 мм. Приготовленный таким образом препарат после микроскопирования может длительно сохраняться в архиве. Если заключающая среда растворима в воде, то на окрашенные препараты наносят такую среду сразу после промывки и осторожно (чтобы избежать появления пузырьков воздуха) накрывают покровным стеклом. Когда заключающая среда застывает, препарат можно исследовать под микроскопом. Примером простой водорастворимой заключающей среды является глицерин-желатина. Ее и другие водорастворимые среды используют чаще при работе с криостатными и замороженными и вибратомными срезами, а также при окраске красителями, экстрагирующимися в этаноле. Для заключения парафиновых срезов чаще всего используют природные смолы (канадский или пихтовый бальзамы, даммарлак) и синтетические среды (биомаунт, полистирол, капрат целлюлозы, DPX, пермаунт), которые нерастворимы в воде, но растворяются в ксилоле. Наиболее распространенными заключающими средами являются канадский бальзам и полистирол. Перед заключением в такие среды срезы необходимо обезводить в спиртах восходящей крепости (например в 80%, 96%, 100% этанолах, абсолютном этаноле-ксилоле 1:1 по 1-3 мин) и просветлить в двух порциях орто - ксилола (1-3 мин). Ксилолы и спирты рекомендуется менять после проводки каждых 40-50 препаратов. Канадский бальзам можно приобретать готовым к применению или в сухом виде. В последнем случае его растворяют в орто - ксилоле до получения густой сиропообразной жидкости.

Для приготовления заключающей среды из полистирола удобно пользоваться рецептурами Д.С.Саркисова (70 мл орто - ксилола, 30 г полистирола, 6 мл дибутилфталата) и Р.Д.Лилли (70 мл орто -ксилола, 25 г полистирола и 5 мл дибутилфталата). Для ускорения растворения полистирола смесь можно поместить в плотно закрытой бутыли в термостат (37 °С). Следует отметить, что не все сорта полистирола пригодны для приготовления заключающей среды, поскольку иногда пластификатор при взаимодействии с растворенными в полистироле примесями образует опалесцирующую при застывании взвесь. Для заключения постоянных препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, которые предполагается длительно сохранять в архиве (десятки лет), следует предпочесть канадский бальзам. При работе с препаратами, окрашенными основными анилиновыми красителями, следует использовать полистирол или другую нейтральную заключающую среду (в канадском бальзаме и других природных смолах анилиновые красители быстро выцветают). Если предполагается исследовать полученные препараты с помощью флуоресцентного или лазерного конфокального микроскопов, то использовать заключающие среды на основе природных смол нельзя (они обладают собственной флуоресценцией).

**День 3 (23.05.2020 г)**

**Тема: «**Методический день»

**День 4 (25.05.2020 г)**

**Тема:** «Уплотнение материала. Обезвоживание»

**Уплотнение материала**

С помощью микроскопа можно изучать только прозрачные срезы, следовательно, они должны быть тонкими (толщиной в сотые или тысячные доли миллиметра). Существуют специальные аппараты — микротомы, по-зволяющие разрезать материал на пластинки требуемой толщины, но для этого необходимо предварительно кусочек уплотнить. Это делают путем замораживания и резки на замораживающем микротоме или пропитыванием застывающими жидкостями (например, подогретым парафином) и последующей резки на обычном микротоме. После фиксации кусочки промывают, обезвоживают, заливают в парафин и затем режут.

**Промывка позволяет очистить материал от фиксатора**. После фиксации в формалине, хромовых и сулемовых жидкостях материал промывают в проточной воде в течение 1—2 суток. После фиксации в смеси с пикриновой кислотой для промывки используют 70% спирт.

От качества обезвоживания зависит качество заливки.

**Обезвоживание проводят в "батарее"** со спиртами, крепость которых постепенно повышается. Обезвоживание ткани производятся постепенно (чтобы не произошло сморщивания) путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50°, 60\*, 70°, 80°, 90°, 96°, 100°: В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка. Спирты разной концентрации готовят по прилагаемой таблице.

|  |  |
| --- | --- |
| **Для получения 100 мл** | **Объем составных частей** |
| Спирт 96° | H2O | Спирт 90° | H2O | Спирт 80° | H2O | Спирт 70° | H2O |
| 40°45°50°60°70°80°90° | 42475263738394 | 5853483727176 | 445056677889- | 565044332211- | 5056637588-- | 5044372512-- | 57647186--- | 43362914--- |

На практике можно пользоваться упрощенным расчетом: брать количество спирта в миллилитрах, равное крепости требуемого рабочего спирта, и к нему доливать столько воды, чтобы их сумма соответствовала цифре крепости исходного спирта. Например, исходный спирт 96%. Для получения 60% спирта следует к 60 мл исходного спирта долить 36 мл воды. Исходным материалом для получения абсолютного (100%) спирта служит 96% этиловый спирт. Отнятие воды проводят с помощью извести (СаСОз) или обезвоженного медного купороса. Медный купорос (меди сульфат) удерживает 5 молекул кристаллизованной воды. Химически чистый медный купорос прокаливают в стеклянной или фарфоровой посуде, помешивая стеклянной палочкой до получения белого порошка безводной соли. Для обезвоживания 100 мл спирта, налитого в банку с притертой пробкой, туда помещают 10 г обезвоженного медного купороса. В течение 1 — 2 дней банку часто встряхивают. Купорос приобретает голубой цвет. Тогда спирт сливают в новую банку, куда насыпают белый порошок купороса, и продолжают его встряхивать. Если купорос слегка посинеет, то спирт сливают в третью банку с белым купоросом. Если после встряхивания купорос перестанет синеть, абсолютный спирт аккуратно сливают или фильтруют в чистую сухую бутылку и закрывают резиновой пробкой. С помощью свежепрокаленной извести спирт можно обезводить быстрее. Для этого его кипятят с негашеной известью 1—2 ч на водяной бане.

**Обезвоживание проводят** в чисто вымытых и высушенных банках или бутылках с притертыми пробками. Для получения качественных препаратов его необходимо проводить постепенно. Нельзя сразу после промывки водой помещать кусочки в 96% спирт. Если же фиксацию или промывку проводили спиртом, то обезвоживание начинают со спирта более высокой концентрации. Материал последовательно переносят в спирт более крепкий. Время нахождения материала в спиртах зависит от размеров кусочков и характера ткани (1—2 ч для маленьких объектов, 1—2 суток для кусочков толщиной 2 см). Обычно его выдерживают в каждом спирту не менее 24 ч. При переносе кусочков в более крепкий спирт их просушивают фильтровальной бумагой. Спирты быстро загрязняются веществами, которые извлекаются из материала, особенно жиром. Их нужно проверять, смешивая с водой. Если при этом появляется белая густая муть — спирты подлежат замене.

**День 5 (26.05.2020г)**

**Тема: «Фиксация»**

**ФИКСАЦИЯ**

Взятый для гистологического исследования материал сразу же должен подвергаться фиксации. Фиксация — метод обработки ткани с целью закрепления ее прижизненной структуры. Это достигается путем воздействия на ткань специальных растворов (фиксаторов). Наиболее существенным изменением, происходящим в тканях под воздействием фиксатора - является процесс свертывания (коагуляции) белков. Количество фиксатора следует брать в 20-100 раз больше объема кусочка фиксируемого материала. Существуют фиксаторы простые и сложные. К простым относятся 10-20% раствор формалина, 96° спирт, 100 (абсолютный) спирт, 1-2% раствор осмиевой кислоты и др. Сложные фиксаторы: спирт - формол (спирт 70° — 100 мл. и формалин 2-5 мл.) жидкость Ценкера (сулема — 5 г, сернокислый натрий — 1 г., двухромовокислый калий - 2,5 г, дистиллированная вода 100 мл., ледяная уксусная кислота 5 мл.) и др. Продолжительность фиксации —от нескольких часов до 1 суток и более в зависимости от свойств фиксатора и характера исследуемого материала.

**Правила работы с фиксаторами**

Практически все фиксаторы относятся к токсичным веществам (альдегиды, ацетоны» спирты), некоторые ядовиты (сулема, тетраоксид осмия, метанол), поэтому необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с реактивами, которые используют в гистологической практике.

Фиксацию и вырезку материала необходимо производить в вытяжном шкафу. Материал, извлеченный из фиксатора, содержащего формалин, желательно в течение нескольких минут промыть в проточной воде, так как пары формалина оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и органов дыхания.

**Промывка в воде**

После фиксации материал промывают (чаще всею в течение нескольких часов в проточной воде) с тем, чтобы избавить его от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей.

Изучить с помощью микроскопа такие фиксированные кусочки органов невозможно, т.к. они не прозрачны. Чтобы кусочек органа можно было микроскопировать, его надо разрезать на очень тонкие пластинки - срезы, толщина которых измеряется в микрометрах. Такие срезы получают с помощью специальных приборов - микротомов. Но для того, чтобы резать на микротоме кусочек ткани, ее надо предварительно уплотнить. Это достигается путем пропитывания застывающими жидкостями - расплавленным парафином. Парафин в воде не растворяется, и поэтому промытый после фиксации кусочек ткани необходимо предварительно обезводить, и только затем пропитывать.

**Характеристика фиксаторов**

**Простые фиксаторы**

**Химическая фиксация:**

- альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид)

- хромовая кислота

- тетраоксид осмия

- спирты (этанол, метанол)

- ацетон

- соли ртути (сулема)

-кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, азотная)

**Альдегиды** - Можно хранить месяцами, надо всего лишь контролировать рН.

**Формалин** - представляющий собой 40% раствор формальдегида. Формальдегид - это газ, растворимый в воде до концентрации 40% по массе. В гистологической практике используют 10% раствор формалина, что соответствует 4% формальдегиду.

Продолжительность фиксации 24—48 ч при 20°С.

Фиксатор может содержать примеси, в основном метанола (до 16%). Методы приготовления свободного от метанола формальдегид:.

**4% формальдегид по Гайеру:**

- 2гр. параформальдегида

- 50мл 0,1М фосфатного буфера (рН 7,4-7,6) = нагревают до 70 °С до просветления раствора, помешивают, охлаждают и фильтруют. Его рН 7,3-7,5.

**40% формальдегид по Глауерт:**

Готовят 40% параформальдегид (40гр порошка формальдегида + 100мл дистиллированной воды при нагревании до 65С, перемешивая. + несколько капель 40%гидроксида натрия до просветления раствора.

**Фиксатор Лилли для кислых гликозаминогликанов.**

-Нитрат свинца 8гр;

- 40% раствор формальдегида 10мл;

- Вода 10мл;

- Этанол 80мл

Продолжительность фиксации 24 часа при комнатной температуре ( при 4С- 2-3дня, 10-14 дней при-25С).

**Фиксатор Жандра для гликогена.**

1. Пикриновая кислота, насыщенная в 96% спирте 85 частей

2. Раствор формальдегида 40% 10 частей

3. Ледяная уксусная кислота 5 частей

**Тетраоксид осмия.**

Не коагулируются, а желатинизируются, ткани не сморщиваются. Одновременно является контрастирующим веществом в электронной микроскопии. Дорогой реагент, поступает в продажу в ампулах по 0,5 - 2 гр. Разбивают в бумаге и помещают в воду больше 24ч для 1-4 % раствора. Хранят я темноте при комнатной температуре месяцами. Для первичной фиксации липидов используют 1% раствор на 0,1 М фосфатном буфере.

Для 1 фиксации: 2% ТО в ДВ -5мл; натрия хлорид -850мг; 0,2М фосфатный буфер- 5мл. Для вторичной используют сахарозу вместо натрия.

**Этиловый спирт (80 %, 90 %, 96 % и 100 %).**

Его применяют для осаждения белков, в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку. Продолжительность фиксации от 2 часов до 1 суток. Увеличение длительности фиксации, особенно в 100 % спирте, нежелательно, так как материал значительно уплотняется и происходит его пересушивание. Оптимальная температура для фиксации материала в спирте +4°С, но ее можно проводить и при комнатной температуре. Если после спиртовой фиксации предстоит резать ткань на замораживающем микротоме или криостате, то кусочки промывают в течение 1 —2 ч до их полного погружения на дно банки, при этом происходит насыщение ткани водой.

**Уранилацетат.**

Используют в электронной микроскопии как третий фиксатор (после альдегида и тетраоксида осмия) и одновременно как контрастер. Хорошо выявляет мембраны благодаря стабилизации фосфолипидов, стабилизации ДНК. Применяют 0.25-2% в воде или в 50-70% спирте (окрашивание 8 минут).

Ацетон используют для увеличения скорости фиксации. Применяют 100% ацетон, для получения которого в коммерческий ацетон засыпают прокаленный сульфат меди (медный купорос) или силикагель. В ацетоне фиксируют кусочки толщиной 3 - 4 мм в течение 2 часов при 20 гр. С или 30 мин— 1 часа в термостате при 60 °С в плотно закрытой посуде. Ацетон значительно уплотняет ткань и при увеличении продолжительности фиксации возможно сморщивание объектов. Чаще ацетон применяют для обработки материала срочных биопсий при его заливке в парафин.

**Кислоты.**

Азотная, пикриновая, уксусная, трихлоруксусная. Быстро проникают, препятствуют сморщиванию, ослабляют состояние гидратации. Входят в состав декальцинирующих смесей.

**Фиксатор Жандра для гликогена.**

- Пикриновая кислота, насыщенная в 96% спирте- 85 частей; раствор формальдегида 40% -10 частей; ледяная уксусная кислота -5 частей.

**Жидкость Буэна.**

Классический фиксатор для экспериментальных исследований: насыщенный раствор пикриновой кислоты - 75 мл; нейтральный 40 % формалин -25 мл; ледяная уксусная кислота -5 мл.

Продолжительность фиксации 1—24 часов при 20 °С. Насыщенный раствор пикриновой кислоты готовят заранее из расчета 3 г. кристаллической пикриновой кислоты на 1 л. горячей дистиллированной воды. После фиксации кусочки отмывают от избытка пикриновой кислоты в 70 % спирте, затем заливают в парафин.

**Сулема (дихлорид ртути).**

Сулему применяют в качестве фиксатора с начала развития гистологии. Готовят насыщенный раствор: 10 г сулемы на 100 мл дистиллированной воды или изотонического раствора хлорида натрия доводят до кипения, охлаждают, фильтруют. Продолжительность фиксации кусочков толщиной 3 мм 6—12 часов при 20 °С. При фиксации сулемой возможно появление в тканях кристаллического осадка, который удаляют путем обработки срезов йодированным 70 % спиртом (на 50 мл 70 % спирта — 5—10 капель 5 % спиртового раствора йода до появления оранжевого цвета). По мере обесцве-чивания йодированного спирта со срезами его заменяют свежей порцией вплоть до полной потери цвета, затем срезы промывают в 3—4 сменах 70 % спирта.

**Сложные фиксаторы**

Составными частями сложных фиксаторов являются простые. Существует множество вариантов фиксирующих смесей. Ниже приведены наиболее распространенные.

**Спирт - формол по Шаферу.**

- 10 % нейтральный формалин, который готовят из 1 части нейтрального

40 % формалина и

- 2-3 частей- 96 % спирта.

Продолжительность фиксации 24-48 ч. Дальнейшая промывка в воде не требуется, и материал сразу же помещают в 96 % спирт.

**Кальций - формол по Бейкеру** используют для фиксации липидов.

10 мл 40% формалина + 90 мл дистиллированной воды; 1 г хлорида кальций; растворы смешивают.

- Продолжительность фиксации 24—48 ч при 20°С.

- Для гистохимических исследований с успехом применяют фиксатор Бейкера, приготовленный из параформальдегида.

- К 50 г параформальдегида и 500 мл дистиллированной воды добавляют с одновременным встряхиванием несколько капель 1 н. гидроксида натрия до исчезновения осадка.

- 10 г хлорида кальция + 500 мл дистиллированной воды.

- Растворы А и Б смешивают, добавляют 0,5 г активированного угля. Перед использованием фильтруют.

Продолжительность фиксации 24—48 часов при 20°С.

**Используется также фиксатор Карнуа**, в состав которого входят: 75 мл- 100 % спирта; 25 мл ледяной уксусной кислоты.

Условия фиксации те же. В случае отсутствия этилового спирта вместо жидкости Карнуа можно использовать смесь следующего состава: изопропиловый спирт -60мл; пропионовая кислота - 30мл; ацетон 10мл; диоксан - 10мл.

Продолжительность фиксации 12-24 ч при 20 °С; для промывки и обезвоживания применяют изопропиловый спирт.

**Жидкость Ценкера — сулемовая смесь.**

- Бихромат калия -2,5г; сульфат натрия- 1 г; дистиллированная вода 100мл (это-жидкость Мюллера); сулема 5г; ледяная уксусная кислота 5мл.

Ледяную уксусную кислоту можно заменить нейтральным 10 % формалином (фиксатор Максимова, ценкер - формол). Продолжительность фиксации 1—24 часов при 20°С. После фиксации материал в течение 12—24 часов отмывают в проточной воде и помещают в йодированный 70% спирт для удаления остатков сулемы. При добавлении 10 мл 2 % раствора тетраоксида осмия хорошо фиксируются и окрашиваются липиды. В последнее время для гистологических исследований часто применяют глутаровый альдегид, параформальдегид, особенно в тех случаях, когда материал предназначается одновременно для нескольких видов исследования (иммуноморфологического, электронно - микроскопического), а его количество ограничено, например, при пункционных биопсиях.

**День 6 (27.05.2020г)**

**Тема:** «Техника окрашивания срезов. Подготовка парафиновых срезов перед окраской»

**ТЕХНИКА ОКРАШИВАНИЯ СРЕЗОВ**

Общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов - В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания. Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии 42 протравы, например, гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.

В гистологической практике применяют основные, кислотные и нейтральные красители – Основные, или ядерные, красители — это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются базофильными. К ним относятся гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый и др. Кислотные красители — это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются эозин, кислый фуксин, Конго красный (конгорот), эритрозин. Нейтральные красители: судан - III, судан - IV, метиленовый синий. Процесс гистологического окрашивания условно подразделяют на прогрессивный и регрессивный, прямой и непрямой, простой и сложный. При прогрессивном типе окрашивания процесс идет до тех пор, пока не достигается интенсивное проникновение красителя в ткань. Регрессивный тип основан на первоначальном перекрашивании структур с последующей дифференцировкой до нужного уровня. Если раствор красителя непосредственно действует на ткань, то говорят о прямом окрашивании. Окрашивание после предварительной

подготовки ткани (протравливания) называется непрямым. Окрашивание одним красителем - простое, а при использовании нескольких красителей — сложное.

Окрашивание срезов для обзорных целей - Различают методы окраски для обзорных целей, применяемые для получения общего представления о морфологии ткани или органа, и специальные, предназначенные для выявления определенных элементов клетки или ткани (например, комплекс Гольджи, митохондрий ,эластический волокон соединительной ткани и т.д.). Ниже рассматриваются лишь некоторые методы окрашивания для обзорных целей. Суть их обычно заключается в том, что при этом окрашиваются ядра и каким-то контрастным красителем – цитоплазма.

**ПОДГОТОВКА ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗОВ ПЕРЕД ОКРАСКОЙ**

Поскольку большинство красителей не проникают в срезы, пропитанные парафином и являются водо - или спирторастворимыми веществами, парафин перед окраской препаратов должен быть удален. Этого достигают в ходе процедуры депарафинирования и регидратации. В качестве растворителя парафина обычно используют орто – ксилол. Для регидратации применяют спирты (этанол) нисходящей крепости. При постановке иммуноцитохимических реакций некоторые фирмы (например Sigma) в своих протоколах рекомендуют перед депарафинированием прогреть предметные стекла в термостате (56 °С).

Проводить депарафинирование и регидратацию срезов, наливая ксилол и спирт непосредственно на предметное стекло, как это рекомендует Г.А.Меркулов, не следует, чтобы избежать токсического воздействия паров ксилола. Целесообразно использовать высокие цилиндрические стаканчики с притертыми крышками. Для депарафинирования и регидратации достаточно пяти стаканчиков. В первые два наливают орто - ксилол. Затем следуют две порции 96%-го этанола и 80%-го этанол. В каждой порции ксилола предметные стекла следует оставить на 3-5 минут. В спирты стекла следует помещать на 2-3 минуты. При перекладывании стекол следует аккуратно промокать их торцевую часть о фильтровальную бумагу, чтобы не загрязнять последующие растворы. Депарафинировать и регидратировать предметные стекла, сложенные по два (срезами наружу) не следует из-за опасности занесения ксилола, который может остаться между стеклами, в спирты и воду. Из 80%-го спирта предметные стекла переносят в дистиллированную воду на 5 (или более) минут. На этом регидратация срезов завершается и можно приступать к окраске.

**День 7 (28.05.2020г)**

**Тема: «**Предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской. Устройство микроскопов и техника микроскопирования»

**ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ЦЕЛЛОИДИНОВЫХ СРЕЗОВ ПЕРЕД ОКРАСКОЙ.**

Для получения хороших результатов окраски препаратов ткани, залитой в целлоидин, не требуется специальная подготовка срезов. Их переносят из 70 % спирта в 50 %, а затем в дистиллированную воду.

В тех случаях, когда применяемый краситель окрашивает целлоидин, его можно удалить из ткани. Для этого целлоидиновые срезы наклеивают на покрытые белком с глицерином предметные стекла, плотно прижимают фильтровальной бумагой, смоченной в 70 % спирте, и заливают гвоздичным маслом. Через 1 мин срез на стекле обрабатывают ацетоном или абсолютным спиртом. После удаления целлоидина срез со стекла переносят в склянку с 70 % спиртом, а затем — в дистиллированную воду.

Желатин невозможно удалить из срезов, если блоки уплотнялись в формалине. Желатиновые срезы, не обработанные в формалине, наклеивают на стекло, покрытое белком с глицерином, подсушивают, заливают 2—4% раствором уксусной кислоты и помещают на 10—15 мин в термостат при 37 "С. Затем срезы промывают в дистиллированной воде и окрашивают.

**УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПОВ И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ.**

Оптическая часть микроскопа. Основной частью оптической системы микроскопа является объектив, увеличивающий изображение предмета. Он состоит из ряда линз, склеенных канадским бальзамом и заключенных в металлическую трубку; на трубке имеется резьба, при помощи которой объектив ввинчивается в специальное гнездо револьвера.

Изображение, даваемое объективом, рассматривают с помощью окуляра, находящегося в верхней части тубуса микроскопа. Биологические микроскопы снабжаются тремя сменными окулярами. На верхней оправе линзы окуляра указано его увеличение. Обычно окуляры дают увеличение в

7, 10 и 15 раз. Общее увеличение объекта микроскопом равно произведению увеличения окуляра на увеличение объектива [10 (окуляр) × 90 (объектив)] = 900 раз.

Осветительное устройство располагается под столиком микроскопа и состоит из конденсора с ирис-диафрагмой и зеркала.

Механическая часть микроскопа. Эта часть состоит из штатива, тубусодержателя с револьвером, винтов для передвижения тубуса (макрометрического и микрометрического), осветительного аппарата и предметного столика микроскопа. Основными частями штатива являются нижняя подставка (ножка), придающая микроскопу устойчивость, и тубусодержатель микроскопа.

Техника микроскопирования. Прежде чем начать микроскопирование, необходимо установить правильное освещение. Для этого с микроскопа снимают окуляр и, глядя прямо в объектив, устанавливают зеркало так, чтобы источник света (лампа или окно) были видны посредине объектива. После предварительной установки света на предметный столик микроскопа кладут готовый препарат и закрепляют его зажимами. При помощи макрометрического винта опускают тубус почти до соприкосновения с покровным стеклом. Затем, глядя в окуляр, постепенно поднимают тубус до появления изображения. Для наведения резкости пользуются микрометрическим винтом.

При микроскопиравании следует держать оба глаза открытыми. Смотрят в микроскоп левым глазом.

Техника приготовления препарата для микроскопирования. Каплю исследуемой жидкости наносят на чистое предметное стекло и осторожно накрывают покровным стеклом. Если препарат готовят с плотной питательной среды, то на предметное стекло наносят капельку чистой водопроводной воды, в нее помещают исследуемую культуру и препарат

накрывают покровным стеклом. Под последним не должно оставаться пузырьков воздуха, так как они мешают микроскопированию. Избыток жидкости, выступающий из-за покровного стекла, убирают фильтровальной бумагой, заранее нарезанной небольшими узкими полосками. Готовый препарат помещают на предметный столик и исследуют.

**День 8 (29.05.2020г)**

**Тема:** «Проведение окрашивания срезов, наклеенных на предметные стекла и свободноплавающих срезов. Просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы)»

**ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.**

В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания.

Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии протравы, например, гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.

Срезы тканей после целлоидиновой и парафиновой заливки, а также полученные на замораживающем микротоме окрашивают в широкогорлых бюксах или на часовых стеклах. Одновременно окрашивают несколько срезов, промывают, дифференцируют и т.д. каждый срез отдельно.

Препараты можно помещать в красящий раствор в специальных контейнерах, предназначенных для одновременного окрашивания большого количества стекол. Если препаратов немного, то рациональнее краситель наносить непосредственно на срез по каплям с помощью пипетки. Остатки красителя можно слить в склянку и использовать повторно. Д. Кисели (1962) предлагал накрывать при этом срезы стеклянным колпаком, а для увлажнения среды оставлять под колпаком смоченную водой вату.

**Окрашивание срезов для обзорных целей.**

Различают методы окраски для обзорных целей, применяемые для получения общего представления о морфологии ткани или органа, и специальные, предназначенные для выявления определенных элементов клетки или ткани (например, комплекс Гольджи, митохондрий ,эластический волокон соединительной ткани и т.д). Ниже рассматриваются лищь некоторые методы окрашивания для обзорных целей. Суть их обычно заключается в том, что при этом окрашиваются ядра и каким-то контрастным красителем - цитоплазма.

**Методика окрашивания срезов гематоксилин – эозином.**

 Эта методика наиболее часто применяется и поэтому должна быть описана более детально. Этим методом можно окрашивать целлоидиновые срезы, депарафинированные, парафиновые или замороженные срезы. Замороженные срезы перед окрашиванием следует обезжирить, поместив их на 20-30 мин или на ночь в 96% спирт. Далее срезы переносят в дистиллированную воду. Целлоидиновые срезы переносят из одного бокса в другой с помощью препаровальной иглы с загнутым концом. Депарафинированные и замороженные срезы можно окрашивать на предметном стекле, наливая или сливая в соответствующие растворы. Растворы красителей при этом можно сливать обратно для повторного использования.

**Порядок окрашивания срезов гематоксилин – эозином следующий:**

1. Срезы переносят в дистиллированную воду.

2. Окрашивают гематоксилином Эрлих 2-5 минут.

3. Промывают в дистиллированной воде.

4. Затем промывают водопроводной водой 3-5 минут.

5. Осуществляют контроль под микроскопом.

6. Дифференцируют 1% раствором хлористоводородной кислоты в 70% спирте 1-2 сек.

7. Быстро переносят срезы в водопроводную воду на 30 мин при частой смене; в водопроводной воде вишневая окраска ядер сменяется синей.

8. Осуществляют контроль под микроскопом; если хроматин и ядрышко видны недостаточно четко, то дифференцировку следует повторить (срезы можно смотреть под большим увеличением, накрыв их покровным стеклом).

9. Промывают в дистиллированной воде.

10.1% водный раствор эозина 0,5-1 мин.

11.Промывают в дистиллированной воде (и дифференцируют, так как вода смывает эозин); время промывки контролируют по цвету среза.

12.Проводят обезвоживание, осветляют в ксилоле, заключают в бальзам.

 В спиртах эозин так же отмывается, так что проводить срезы по спиртам следует быстро. Время окрашивания в гематоксилине нужно установить на первых 2-3 срезах и затем все срезы данного блока окрашивать одинаково. Дифференцировку в растворе хлористоводородной кислоты в спирте можно не проводить, но в этом случае структура ядра будет менее четкой и в цитоплазме может быть синеватый фон.

**ПРОСВЕТЛЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ СРЕЗОВ**

Одним из основных условий, определяющих пригодность гистологических препаратов к микроскопическому исследованию, является их прозрачность. Кроме того, препараты должны быть защищены от высыхания и загрязнения. Все это обеспечивается просветлением и заключением в специальные среды, которые можно подразделить на смешивающиеся с водой (глицерин, гуммиарабик, поливиниловый спирт, желатин) и не смешивающиеся с водой (ксилол, толуол, их смеси с фенолом, эфирные масла).

Смешивающиеся с водой просветляющие вещества одновременно являются средой для заключения и приготовления постоянных препаратов.

Заключение в среды, смешивающиеся с водой - Из этих сред чаще применяют глицерин-желатин.

Используют также чистый глицерин, однако этот метод не позволяет приготовлять постоянные препараты.

Р. Лилли рекомендует для этих целей гумми-сироп Апати - чистый гуммиарабик 50г.,

сахар-рафинад 50г,

дистиллированная вода 50 мл.

Смесь растворяют на водяной бане при постоянном помешивании, затем добавляют 0,5г тимола.

Глицерин—желатин по Кайзеру в модификации Маллори - Замочить 40 г желатина в 210 мл дистиллированной воды на 2 час. Добавить 250 г глицерина и 5 мл расплавленного фенола. Осторожно нагревать при постоянном перемешивании 10-15 мин, пока смесь не станет однородной. Хранить в холодильнике при 0-5° и перед употреблением расплавлять. Маллори отмечает, что фенол оказывает разрушающее

действие на препараты, окрашенные квасцовым гематоксилином. Фенол можно заменить нескольким кристалликами тимола

Среды, смешивающиеся с водой (кроме глицерина), предварительно нагревают на водяной бане, капают нагретой стеклянной палочкой или пипеткой на расправленный срез, слегка подсушивают и покрывают чистым и сухим покровным стеклом. Чистой стеклянной палочкой или обезжиренным пальцем слегка прижимают покровное стекло. При этом излишки среды выдавливаются и их аккуратно удаляют чистой тканью.

Для длительного хранения препаратов, чтобы избежать их высыхания, многие авторы рекомендуют окантовывать покровное стекло тонким слоем парафина или целлоидина. Однако опыт показывает, что заключенные в глицерин-желатин препараты и без окантовки хорошо сохраняются свыше 10 лет.

**День 9 (30.05.2020г)**

**Тема:** «Обработка биопсионного материала. Приготовление препаратов для электронно-микроскопического исследования»

**ОБРАБОТКА БИОПСИОННОГО МАТЕРИАЛА**

Биопсия — иссечение тканей из живого организма с целью морфологического исследования для определения характера патологического процесса. Значение этого метода исследования трудно переоценить, так как он позволяет уточнить диагноз, определить морфологические особенности патологического процесса. На основании полученных данных врач имеет возможность избрать наиболее правильную тактику лечения больного. Особенно большое значение биопсия имеет при определении опухолей, когда малейшая невнимательность и неточность могут послужить причиной роковой ошибки.

**Методы проведения биопсий:**

1) иссечение каким-либо хирургическим инструментом кусочка органа или ткани;

2) соскабливание поверхностных слоев участка поражения (в этих случаях материал сразу наносят на предметное стекло и фиксируют);

3) пункция (или аспирация) — взятие материала с помощью специальных игл. Этот метод получил особенно широкое применение. Помимо кроветворных органов, успешно осуществляют пункцию таких жизненно важных органов, как печень, почка и др.,

4) отрыв частиц слизистых оболочек внутренних органов при помощи специальных приспособлений (гастроскоп, бронхоскоп, эзофагоскоп, цистоскоп и др.).

Исследование биопсийного материала, а также органов и тканей, удаленных при хирургических операциях, производят врачи-патологоанатомы в патологоанатомическом отделении больницы.

Срезы окрашивают гематоксилин-эозином, а в случае необходимости применяют другие методы окрашивания. На гистологических препаратах надписывают номер исследования и две последние цифры года исследования (например, 10121/68; речь идет об исследовании № 10121 за 1968 г.). Результаты микроскопического исследования врач-патологоанатом записывает на бланке направления на исследование. Исследование биопсийного и операционного материала рекомендуется проводить в течение 3—4 дней, за исключением костной ткани и обызвествленных объектов, когда срок обработки может быть продлен до 6—7 сут, ибо в таких случаях требуется декальцинация присланного материала.

**Исследование материала при срочной биопсии.**

Получив из операционной материал для экстренной биопсии, врач-патологоанатом быстро вырезает небольшой кусочек из наиболее характерного участка, лаборант помещает его в пробирку, содержащую 10% раствор формалина и осторожно подогревает содержимое над спиртовкой (или газовой горелкой) до появления паров (2—3 раза). Затем исследуемую ткань промывают в холодной проточной воде 1—2 мин, режут на замораживающем микротоме, окрашивают срезы гематоксилин-эозином, быстро обезвоживают, просветляют, заключают в бальзам. Все данные исследования биопсийного и операционного материала лаборант переписывает с бланка направления на исследование, в книгу записи биопсийного и операционного материала с указанием даты ответа и фамилии врача, проводившего исследование. После исследования биопсийного или операционного материала бланк направления на исследование передают в лечебное отделение. Ответ направляют вместе с разносной книгой, где указывают дату отправления, фамилию и инициалы больного, номер исследования, клиническое отделение.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННО – МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.**

Для исследования препаратов в электронном микроскопе вместо предметных стекол применяются специальные пленки, незначительно поглощающие электроны. Они крепятся на опорные сетки. Материалом для приготовления пленок служат коллодий, окись алюминия и кварц. Тщательно очищенный от различных примесей и нанесенный на пленку исследуемый материал после испарения жидкости оставляет на ней тончайший слой, который и подлежит микроскопии. В электронном микроскопе можно также исследовать срезы тканей, клеток, микроорганизмов, полученные с помощью ультрамикротома. Препараты контрастируют с помощью электронно-плотных (задерживающих электроны) веществ, используя разные методы напыление тяжелых металлов, обработка фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацета-том, солями осмиевой кислоты и др

**День 10 (01.06.2020г)**

**Тема:** «Проведение микроскопического исследования цитологических и гистологических мазков. Архивирование оставшегося после исследования материала»

**ПРОВЕДЕНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ МАЗКОВ**

**Гистологическое исследование** - это исследование тканей под микроскопом. С помощью специальных растворов кусочек ткани обезвоживают и делают жирорастворимым для последующей пропитки парафином в специальных формах. С помощью микротома с вмонтированным очень острым ножом, который может снимать слои толщиной от 3 микрометров, выполняют срезы. В последующем срезы монтируют на стекло и проводят их подготовку для окраски, что позволяет сделать видимым под микроскопом клетки и их элементы, а также различные элементы межклеточного вещества тканей. Специалист-патологоанатом по результатам исследования объекта под микроскопом, дает заключение, на основании которого формируется клинический диагноз или выставляет окончательный диагноз

В современной медицине используются два способа проведения гистологического исследования.

При обычном способе полученный биоптат обрабатывают фиксирующим веществом, которое не дает ему распадаться под воздействием ферментов, и уплотняют, заливая парафином. Затем полученный препарат нарезают микротомом на «ломтики» толщиной не более 8 мкм и окрашивают. После этого препарат изучают при помощи микроскопа и выносят заключение. Обычно результаты готовы через 7–10 дней. Дольше всего приходится ждать результатов обследования биоптата костной ткани — около 2 недель.

Однако иногда результаты гистологического исследования нужны врачу немедленно, в течение часа — например, при проведении операции, когда встает вопрос о немедленном удалении или сохранении органа. В этом случае применяется ускоренная методика гистологического исследования, при которой биоптат замораживают, режут микротомом и сразу проводят микроскопию. Исследование занимает всего час или менее

Выделяются следующие виды микроскопии:

1) световая микроскопия (наиболее распространенный вид микроскопии, при этом разрешающая способность микроскопа составляет 0,2 мкм);

2) ультрафиолетовая микроскопия (разрешающая способность микроскопа составляет 0,1 мкм);

3) люминисцентная микроскопия (применяется для определения в исследуемом гистологическом препарате определенных химических структур);

4) фазово-контрастная микроскопия (применяется для обнаружения и изучения определенных структур в неокрашенных гистологических препаратах);

5) поляризационная микроскопия (используется в основном для изучения волокнистых структур);

6) микроскопия в темном поле применяется для изучения живых объектов;

7) микроскопия в падающем свете (предназначена для изучения толстых объектов);

8) электронная микроскопия (наиболее современный вид микроскопии, имеющий разрешающую способность 0,1 – 0,7 нм). Имеются две разновидности электронной микроскопии – просвечивающая (трансмиссионная) и сканирующая (или растворная) микроскопия, дающая отображение поверхностных ультраструктур.

**Цитологическое исследование**.

Принципиально цитологическое исследование отличается от гистологического тем, что при нём проводится не исследование ткани, а исследование клеток. Так, далеко не всегда удается взять кусочек ткани, да и не всегда это нужно. Выполняется такое исследование с целью раннего выявления или исключения наличия предопухолевых заболеваний. При этом с поверхности подозрительного образования берутся только клетки. После обработки и окрашивания препарата паталогоанатом исследует полученные клетки и дает заключение о том, какой же природы это образование.

Критерии цитологической диагностики злокачественных новообразований составляются из оценки клетки, ядра и ядрышка.

**Клетка:**

– увеличена в размере, иногда гигантская, редко размер близок к норме, что затрудняет цитологическую диагностику, например, при коллоидном, тубулярном раке, маститоподобном варианте долькового рака молочной железы, фолликулярном раке щитовидной железы, карциноиде, почечноклеточном светлоклеточном раке, высокодифференцированных веретеноклеточных саркомах;

– изменение формы и полиморфизм клеточных элементов;

– нарушение соотношения ядра и цитоплазмы в сторону увеличения доли ядра;

– диссоциация степени зрелости ядра и цитоплазмы, например, молодое ядро в ороговевшей цитоплазме при высокодифференцированном плоскоклеточном раке.

**Ядро:**

– увеличение размера, полиморфизм, бугристость, неравномерный рисунок хроматина, наиболее постоянный признак – неровность контуров, гиперхромия, фигуры клеточного деления в цитологических препаратах сравнительно редки.

**Ядрышко:**

– число ядрышек больше, чем в нормальной клетке, ядрышки увеличены в размере, неправильной формы.

Несмотря на присутствие критериев злокачественности у подавляющего большинства клеток, в некоторых клетках рака эти критерии могут отсутствовать или быть выражены в неполном объеме. Необходимо обращать внимание на особенности взаимного расположения клеток, характер межклеточных связей. Заключение формулируют по совокупности признаков при достаточном количестве клеточного материала. Попытка оценить мазок по неадекватно взятому материалу – наиболее частая причина ошибочных заключений.

*Основные задачи цитологической диагностики состоят в следующем:*

1. Формулировка заключения до лечения.
2. Интраоперационная срочная диагностика.
3. Контроль эффективности лечения.
4. Оценка важнейших факторов прогноза течения заболевания.

*Цитологическое заключение до лечения включает:*

* определение гистогенеза новообразований;
* установление степени дифференцировки опухолевого процесса;
* уточнение степени распространенности опухоли;
* изучение фоновых изменений;
* определение некоторых факторов прогноза;
* возможность исследования бактериальной флоры.

Современное цитологическое заключение не только констатирует наличие рака, но и указывает гистологический тип опухоли и степень дифференцировки согласно общепринятым международным классификациям (МКБ-О и ВОЗ).

Критериями достоверности цитологического метода являются результаты сопоставления с плановым гистологическим исследованием. Наибольший процент совпадений цитологического заключения с окончательным гистологическим заключением наблюдается при исследовании образований кожи, молочной, щитовидной железы, при метастатическом поражении лимфатических узлов. Результаты исследования гиперпластических процессов в эндометрии неудовлетворительны (достоверность 30–50%) и заставляют искать пути совершенствования диагностики. Достоверность цитологической диагностики патологии шейки матки составляет 75–90%. 3–24% исследований, в зависимости от локализации и способа получения материала, оказываются неудачными из-за неадекватно полученного, неинформативного материала.

Интраоперационная цитологическая диагностика – одно из основных направлений цитологического метода исследования. Во время операции, используя цитологический метод, уточняется характер патологического процесса, степень распространенности с выявлением метастазов в лимфатические узлы, печень и другие органы, производится контроль радикальности выполненной операции с исследованием краев резекции. Роль цитологии возрастает при разработке показаний к расширенным лимфоаденэктомиям и при определении так называемых «сторожевых», или «сигнальных», лимфатических узлов, которых может быть шесть, и применение гистологического метода невозможно из-за длительности исследования. По данным ведущих клиник, ошибка срочного гистологического исследования «сторожевых» лимфатических узлов составляет 25%, поэтому они рекомендуют использовать интраоперационное цитологическое исследование отпечатков с поверхности разрезанного лимфатического узла. По нашим данным, достоверность срочного цитологического исследования по выявлению метастатического поражения лимфатических узлов составляет 97-99%.

**АРХИВИРОВАНИЕ ОСТАВШЕГОСЯ ПОСЛЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛА**

В патолого-анатомическом бюро (отделении) формируется архив, который включает следующие материалы:

- Направления;

 -Протоколы;

- Журналы;

- микропрепараты;

- тканевые образцы в парафиновых блоках;

- тканевые образцы в 10%-ном растворе нейтрального формалина;

- материалы, полученные по результатам патолого-анатомических вскрытий, указанные в пункте 34 порядка проведения патолого-анатомических вскрытий, утвержденного приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2013 г. № 354н.

Сроки хранения в архиве патолого-анатомического бюро (отделения) биопсийных (операционных) материалов и документов, оформленных в рамках патолого-анатомических исследований:

Тканевые образцы в 10%-ном растворе нейтрального формалина при наличии опухолевого или опухолеподобного процесса — не менее одного года с даты оформления протокола, в прочих случаях - не менее чем до окончания оформления протокола;

Микропрепараты и тканевые образцы в парафиновых блоках - в течение срока хранения медицинской документации пациента;

Направления и протоколы — в течение срока хранения медицинской документации пациента.

**День 11 (02.06.2020г)**

**Тема:** «Оценка качества приготовленных гистологических препаратов. Интерпретация результатов исследования»

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

**Качественно приготовленный гистологический препарат должен:**

* иметь толщину не более 10 мкм,
* быть хорошо расправленными без образования складок и разрывов;

· при невозможности получить качественный срез допускается изготовление срезов и их фрагментов различной толщины;

* окраска срезов должна быть равномерной с четким дифференцированием различных структур;
* срезы должны быть хорошо просветлены;
* не допустимо загрязнение срезов инородными частицами, кристаллами красителя, а также попадание пузырьков воздуха под покровное стекло;
* из одного объекта изготавливают 1 - 2 среза для одной методики окраски;
* при необходимости число срезов может быть большим, вплоть до серии последовательных срезов;
* после изготовления препаратов на предметном стекле тушью или восковым карандашом обозначают номер экспертного исследования и год изготовления гистологических препаратов.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Врач–гистолог получает материал и начинает он с описания макроскопической картины. То есть в начале он описывает внешний вид (цвет, плотность, видимые изменения поступившего к нему органа или кусочка ткани). Затем препарат готовится (информация об этом представлена выше) и изучается уже непосредственно под микроскопом. Изучается микроскопическая картина, которой врач-гистолог даёт описание и в конце ставит диагноз. В направлении на гистологию лечащим врачом часто указывается предварительный диагноз или диагноз под вопросом, который, собственно, может подтвердиться или нет.

**День 12 (03.06.2020г)**

**Тема:** «Выполнение мер санитарно-эпидемиологического режима в ККПАБ и цитологической лаборатории: проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; утилизация отработанного материала»

**СРЕДСТВА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ**

Средствами индивидуальной защиты при работе в лабораториях являются халаты, косынки или шапочки, прорезиненный или полиэтиленовый фартук, резиновые перчатки, защитные очки.

Прорезиненный или полиэтиленовый фартук, резиновые перчатки, защитные очки (должны плотно прилегать к лицу) необходимы при работе с биологическим материалом и едкими веществами.

Халат является формой одежды медицинского персонала, стирается по мере загрязнения, но не реже 2 раз в неделю. В случае загрязнения биологическим материалом обязательно предварительное замачивание в дезинфицирующем растворе в соответствии со стандартом «Дезинфекция и стерилизация в медицинской практике: основные нормы и правила» (60 мин в 0,5% растворе хлорамина).

Перчатки необходимо одевать во время каждой процедуры работы с пациентами или с биологическим материалом. При работе с пациентами и при проведении аналитических манипуляций используются одноразовые диагностическо-смотровые нестерильные перчатки. Для обработки и мойки инструментов используют технические перчатки. Использованные перчатки погружаются в дезинфицирующий раствор на 60 минут.

Маска и очки необходимы при возможности разбрызгивания биологического материла. Маска должна меняться через каждые 4 часа работы. Очки после каждого использования протирают дезинфицирующим раствором, промывают проточной водой, высушивают.

**ПРОВЕДЕНИЕ МЕРОПРИЯТИЙ ПО СТЕРИЛИЗАЦИИ И ДЕЗИНФЕКЦИИ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ, ИНСТРУМЕНТАРИЯ, СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ**

Дезинфекция – комплекс мероприятий, направленных на уничтожение возбудителей болезней и создание условий, препятствующих их распространению в окружающей среде. Лабораторный инструментарий (иглы, скарификаторы, капилляры, предметные стекла, пробирки, меланжеры, счетные камеры, кюветы спектрофотометров, пипетки, наконечники, резиновые груши и т.д.), биологический материал, посуда после каждого использования подвергаются тщательной дезинфекции.

Дезинфекцию изделий медицинского назначения можно осуществлять следующими методами:

1. Кипячение в дистиллированной воде в течение 30 минут, или в 2% растворе питьевой соды – 15 мин. Данным методом подвергаются дезинфекции изделия из стекла, металла, термостойких полимерных материалов, резины.

2. Паровой метод – обработка водяным насыщенным паром под избыточным давлением 0,5 кгс/см2 (4,9\*104 Па) при температуре 1100С в течение 20 мин. Таким способом можно дезинфицировать изделия из стекла, металла, резины, латекса и термостойких полимеров.

3. Воздушный метод – сухой горячий воздух при температуре 1200С в течение 45 мин. Применяется для дезинфекции изделий из стекла и металла.

4. Химический метод – растворы химических веществ, температура которых не менее 180С. Данным методом подвергаются дезинфекции изделия из стекла, коррозионностойкого металла, полимерных материалов, резины.

В качестве химических дезинфицирующих средств можно применять следующие растворы:

· 3% раствор хлорамина – 60 мин;

· 6% раствор перекиси водорода – 60 мин;

· 6% раствор перекиси водорода с 0,5% раствором моющего средства, разрешенного к применению МЗ РБ- 60 мин;

· 4% раствор формалина (по формальдегиду) – 60 мин;

· 2,5% раствор глютарового альдегида – 30 мин;

· 0,5 раствор дезоксона-1 – 60 мин;

· 0,6% раствор нейтрального гипохлорита кальция – 60 мин; - 0,5% раствор сульфохлорантина-Д – 60 мин.

Дезинфицирующие растворы используются однократно. Емкости для проведения дезинфекции должны быть четко промаркированы, иметь крышки. Изделия либо полностью погружают в раствор, либо двукратно протирают салфеткой из бязи или марли с интервалом 15 мин.

При загрязнении раствора кровью его обеззараживающие свойства снижаются, поэтому пипетки, пробирки, капилляры, загрязненные кровью, дезинфицируются в двух емкостях. При дезинфекции изделий, имеющих внутренние каналы, растворы дезинфицирующего средства в объеме 5-10 мл пропускают через канал с помощью груши для удаления остатков крови, сыворотки и т.д.

После дезинфекции способом погружения изделия промывают в проточной воде до полного удаления запаха дезинфицирующего средства. По окончании исследования пробы биологического материала вместе с посудой, в которой они доставлялись в лабораторию, обеззараживаются в автоклаве.

Обеззараживание отработанного биологического материала допускается также химическим способом с использованием дезинфицирующих средств в соответствующих концентрациях, разрешенных к применению МЗ РБ. Отходы крови (сгустки, сыворотки и др.) в специальных емкостях (ведрах, кастрюлях с крышками) засыпают сухой хлорной известью, белильной известью, нейтральным гипохлоритом кальция в соотношении препарата и отходов 1:5, перемешивают и оставляют на 60 мин.

В процессе работы использованные наконечники, планшеты погружаются в емкость с 6%-ым раствором перекиси водорода или 70%-ым спиртом на 2 ч, после чего промываются под проточной водой, затем споласкиваются дистиллированной водой и высушиваются, либо после окончания работы подвергаются паровой дезинфекции в автоклаве.

Кюветы измерительной аппаратуры, пластиковые пробирки и т.д. обеззараживаются 6%-ым раствором перекиси водорода, и промываются проточной водой.

Спектрофотометры и другая аппаратура, содержащая оптику, протирается тампоном, смоченном в 70%-ом спирте, с экспозицией 15 мин. Затем обрабатывается 96%-ым спиртом для удаления влаги.

Рабочие поверхности столов, центрифуг, термостатов, дозаторов, лотков в конце каждого рабочего дня протирают ветошью, смоченной в дезинфицирующем растворе, а в случае загрязнения кровью их немедленно следует обработать дважды с интервалом 15 мин дезинфицирующим средством (перекись водорода – 6,0%). Использованную ветошь сбрасывают в емкость с дезинфицирующим раствором, которую маркируют: «Для использованной ветоши». При загрязнении кровью или секретами мебели, инвентаря, приборов их следует немедленно дважды протереть ветошью, ватными или марлевыми тампонами, обильно смоченными дезинфицирующими растворами.

Перчатки после окончания работы, обеззараживают погружением в 3%ый раствор хлорамина или 6%-ый раствор перекиси водорода на 1 ч, или кипячением в течение 30 мин. Влажная уборка помещений производится горячим (500-600С) мыльным раствором ежедневно. Генеральная уборка помещений проводится один раз в неделю с обязательной дезинфекцией.

**Предстерилизационная очистка лабораторного инструментария**

После дезинфекции лабораторный инструментарий, соприкасающийся с раневой поверхностью или слизистыми оболочками обследуемого, подлежит обязательной предстерилизационной очистке (ручным или механическим способом) и стерилизации.

Предстерилизационная очистка предусматривает удаление белковых, жировых, механических загрязнений и остаточных количеств лекарственных препаратов. Она осуществляется ручным или механическим способом с применением моющих средств. В качестве моющих средств применяют «Биолот» (5 г на 1 л воды), а также растворы, содержащие 0,5% перекись водорода с синтетическими моющими средствами, разрешенными к применению.

Последовательность ручной предстерилизационной очистки:

1. Замачивание в моющем растворе при полном погружении изделия.

2. Мойка каждого изделия в моющем растворе при помощи ерша или ватно-марлевого тампона в течение 0,5±0,1 мин.

3. Споласкивание под проточной водой. При применении моющего средства «Биолот» в течение 3,0±1,0 мин.; других моющих средств – 10, ±1,0 мин.

4. Споласкивание дистиллированной водой в течение 0,5±0,1 мин.

5. Сушка горячим воздухом при температуре 85℃ до полного

исчезновения влаги.

Механическую очистку осуществляют с помощью специального оборудования струйным, ротационным методами, ершеванием или с применением ультразвука. Моющие средства те же. Качество предстерилизационной очистки изделий оценивают на наличие крови и путем постановки азопирамовой пробы остаточных количеств щелочных компонентов моющего вещества. Самоконтроль в КДЛ проводиться ежедневно, контролю подвергают не менее 1% от одновременно обрабатываемых изделий одного наименования, но не менее 3-5 единиц. При положительной пробе на кровь или моющее средство всю группу контролируемых изделий подвергают повторной обработке до получения отрицательных результатов. Контроль качества предстерилизационной очистки работники санитарно-эпидемиологической службы проводят 1 раз в квартал.

**УТИЛИЗАЦИЯ ОБРАБОТАННОГО МАТЕРИАЛА**

В соответствии с п. 37 приказа МЗ РФ от 6 июня 2013 г. № 354н "О порядке проведения патолого-анатомических вскрытий" медицинские отходы, образовавшиеся в результате проведения патолого-анатомического вскрытия, включая гистологические препараты и биологические материалы, утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10. Согласно классификации медицинских отходов (п. 2.1 СанПиН 2.1.7.2790-10), паталого-анатомические отходы относятся к отходам класса Б. Патологоанатомические отходы класса Б (в том числе гистологические препараты), согласно п 4.18 СанПиН 2.1.7.2790-10, подлежат кремации (сжиганию) или захоронению на кладбищах в специальных могилах на специально отведенном участке кладбища в соответствии с требованиями законодательства РФ.

Отходы класса А, кроме пищевых, могут удаляться из структурных подразделений с помощью мусоропровода или пневмотранспорта. Не допускается сброс в мусоропровод предметов, которые могут привести к механическому перекрытию (засору) ствола мусоропровода. Сброс отходов в

мусоропровод должен осуществляться в упакованном виде. Конструкция, материалы и устройство мусоропроводов и пневмотранспорта должны обеспечивать возможность проведения их чистки, мойки, дезинфекции и механизированного удаления отходов из мусоросборных камер. Мусоросборные камеры оборудуются контейнерами, подводкой воды и канализационным трапом. Запрещается сброс отходов из мусоропровода (пневмотранспорта) непосредственно на пол мусороприемной камеры. Должен быть обеспечен запас контейнеров для мусороприемной камеры не менее чем на одни сутки. Контейнеры моются после каждого опорожнения, дезинфицируются не реже одного раза в неделю. Чистка стволов трубопроводов, приемных устройств, мусоросборных камер проводится еженедельно.

Профилактическая дезинфекция, дезинсекция проводятся не реже одного раза в месяц, дератизация - по мере необходимости.

Крупногабаритные отходы класса А собираются в специальные бункеры для крупногабаритных отходов. Поверхности и агрегаты крупногабаритных отходов, имевшие контакт с инфицированным материалом или больными, подвергаются обязательной дезинфекции перед их помещением в накопительный бункер.

 Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Для сбора острых отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокалываемые влагостойкие емкости (контейнеры). Емкость

должна иметь плотно прилегающую крышку, исключающую возможность самопроизвольного вскрытия. Для сбора органических, жидких отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокалываемые влагостойкие емкости с крышками (контейнеры), обеспечивающими их герметизацию и исключающими возможность самопроизвольного вскрытия. В случае применения аппаратных методов обеззараживания в организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, на рабочих местах допускается сбор отходов класса Б в общие емкости (контейнеры, пакеты), использованных шприцев в неразобранном виде с предварительным отделением игл (для отделения игл необходимо использовать иглосъемники, иглодеструкторы, иглоотсекатели), перчаток, перевязочного материала и так далее.

Мягкая упаковка (одноразовые пакеты) для сбора отходов класса Б должна быть закреплена на специальных стойках-тележках или контейнерах.

После заполнения пакета не более чем на 3/4 сотрудник, ответственный за сбор отходов в данном медицинском подразделении, завязывает пакет или закрывает его с использованием бирок-стяжек или других приспособлений, исключающих высыпание отходов класса Б. Твердые (непрокалываемые) емкости закрываются крышками. Перемещение отходов класса Б за пределами подразделения в открытых емкостях не допускается.

При окончательной упаковке отходов класса Б для удаления их из подразделения (организации) одноразовые емкости (пакеты, баки) с отходами класса Б маркируются надписью "Отходы. Класс Б" с нанесением названия организации, подразделения, даты и фамилии ответственного за сбор отходов лица.

Дезинфекция многоразовых емкостей для сбора отходов класса Б внутри организации производится ежедневно.

Медицинские отходы класса Б из подразделений в закрытых одноразовых емкостях (пакетах) помещают в контейнеры и затем в них перемещают на участок по обращению с отходами или помещение для временного хранения медицинских отходов до последующего вывоза транспортом специализированных организаций к месту обеззараживания/обезвреживания. Доступ

посторонних лиц в помещения временного хранения медицинских отходов запрещается. Контейнеры должны быть изготовлены из материалов, устойчивых к механическому воздействию, воздействию высоких и низких температур, моющих и дезинфицирующих средств, закрываться крышками, конструкция которых не должна допускать их самопроизвольного открывания.

При организации участков обеззараживания/обезвреживания медицинских отходов с использованием аппаратных методов разрешаются сбор, временное хранение, транспортирование медицинских отходов класса без предварительного обеззараживания в местах образования при условии обеспечения необходимых требований эпидемиологической безопасности.

При этом организация, осуществляющая медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, должна быть обеспечена всеми необходимыми расходными средствами, в том числе одноразовой упаковочной тарой.

Патолого-анатомические и органические операционные отходы класса Б (органы, ткани и так далее) подлежат кремации (сжиганию) или захоронению на кладбищах в специальных могилах на специально отведенном участке кладбища в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации. Обеззараживание таких отходов не требуется.

Допускается перемещение необеззараженных медицинских отходов класса Б, упакованных в специальные одноразовые емкости (контейнеры), из

удаленных структурных подразделений (здравпункты, кабинеты, фельдшерско-акушерские пункты) и других мест оказания медицинской помощи в медицинскую организацию для обеспечения их последующего обеззараживания/обезвреживания.

Работа по обращению с медицинскими отходами класса В организуется в соответствии с требованиями к работе с возбудителями 1-2 групп патогенности, к санитарной охране территории и профилактике туберкулеза.

Отходы класса В подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) физическими методами (термические, микроволновые, радиационные и другие). Применение химических методов дезинфекции допускается только для обеззараживания пищевых отходов и выделений больных, а также при организации первичных противоэпидемических мероприятий в очагах. Выбор метода обеззараживания (дезинфекции) осуществляется при разработке схемы сбора и удаления отходов. Вывоз необеззараженных отходов класса В за пределы территории организации не допускается.

Отходы класса В собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) красного цвета или имеющую красную маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Жидкие биологические отходы, использованные одноразовые колющие (режущие) инструменты и другие изделия медицинского назначения помещают в твердую (непрокалываемую) влагостойкую герметичную упаковку (контейнеры). Мягкая упаковка (одноразовые пакеты) для сбора отходов класса В должна быть закреплена на специальных стойках (тележках) или контейнерах. После заполнения пакета не более чем на 3/4 сотрудник, ответственный за сбор отходов в данном медицинском подразделении, с соблюдением требований биологической безопасности завязывает пакет или закрывает с использованием бирок-стяжек или других приспособлений,

исключающих высыпание отходов класса В. Твердые (непрокалываемые) емкости закрываются крышками. Перемещение отходов класса В за пределами подразделения в открытых емкостях не допускается.

 При окончательной упаковке отходов класса В для удаления их из подразделения одноразовые емкости (пакеты, баки) с отходами класса В маркируются надписью "Отходы. Класс В" с нанесением названия организации, подразделения, даты и фамилии ответственного за сбор отходов лица.

Медицинские отходы класса В в закрытых одноразовых емкостях помещают в специальные контейнеры и хранят в помещении для временного хранения медицинских отходов.

Использованные ртутьсодержащие приборы, лампы (люминесцентные и другие), оборудование, относящиеся к медицинским отходам класса Г, собираются в маркированные емкости с плотно прилегающими крышками любого цвета (кроме желтого и красного), которые хранятся в специально выделенных помещениях.

Сбор, временное хранение отходов цитостатиков и генотоксических препаратов и всех видов отходов, образующихся в результате приготовления их растворов (флаконы, ампулы и другие), относящихся к медицинским отходам класса Г, без дезактивации запрещаются. Отходы подлежат немедленной дезактивации на месте образования с применением специальных средств. Также необходимо провести дезактивацию рабочего места. Работы с такими отходами должны производиться с применением специальных средств индивидуальной защиты и осуществляться в вытяжном шкафу. Лекарственные, диагностические, дезинфицирующие средства, не подлежащие использованию, собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного).

**День 13 (04.06.2020 г)**

**Тема: «**Методический день»

**День 14 (05.06.2020 г)**

**1. Определение понятия клетка. Общая характеристика строения клетки, физико-химический состав клетки.**

Клетка — это элементарная структурная, функциональная и генетическая единица всех живых организмов. Она была открыта в 1665 г. Р. Гуком. Любая клетка имеет клеточную мембрану — плазмолемму, которая отделяет ее от внеклеточной среды или окружающих клеток. Молекулярную основу плазмолеммы составляют два слоя фосфолипидов со встроенными в них белками, которые выполняют роль белковых каналов или пор.

Важнейшие функции плазмолеммы — пограничная, биотрансформирующая, транспортная и рецепторная. Пограничная функция заключается в отграничении цитоплазмы от окружающей среды и взаимодействии с ней. Биотрансформирующая функция — это обеспечение биохимических превращений поступающих в клетку веществ, в том числе и лекарственных. Транспортная функция — это перенос через мембрану веществ, необходимых для поддержания постоянства внутренней среды. Рецепторная функция — это способность клетки к избирательному взаимодействию с определенными химически активными веществами (гормонами, медиаторами и др.).

Каждая клетка состоит из двух основных компонентов — ядра и цитоплазмы.

Ядро окружено ядерной оболочкой — кариолеммой. Она отделяет ядро от цитоплазмы, выполняя формообразующую и транспортную функции. Ядро заполнено ядерным соком — кариоплазмой, в состав которой входят белки, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот. В ядре осуществляется хранение, передача и реализация генетической информации, регуляция жизнедеятельности клетки.

Основной единицей хранения генетической информации служит хроматин, состоящий из комплекса ДНК и соответствующий хромосомам, которые не различимы как индивидуальные структуры в интерфазном ядре.

Цитоплазма участвует в процессах метаболизма и поддержания постоянства внутренней среды клетки. Она содержит постоянно присутствующие структуры, специализированные на выполнении определенных функций, которые называют органеллами (органоидами) и временными компонентами — включениями, образованными в результате накопления продуктов метаболизма. Выделяют органеллы общего назначения и специализированные. В свою очередь, органеллы общего назначения по наличию мембраны классифицируют на мембранные и немембранные. К мембранным органеллам относят: эндоплазматическую сеть, комплекс Гольджи, лизосомы и пероксисомы, вакуоли, митохондрии; немембранными являются рибосомы, клеточный центр, микротрубочки и микрофиламенты, реснички.

Эндоплазматическая сеть (ЭПС) обеспечивает синтез липидов, углеводов и белков, служит главным депо ионов Ca2+, обеспечивает транспорт веществ внутри клетки. Выделяют две разновидности ЭПС: гранулярную (шероховатую) и агранулярную (гладкую).

На наружной поверхности мембраны агранулярной сети отсутствуют рибосомы, поэтому она имеет гладкую форму. Пластинчатый комплекс (комплекс Гольджи) синтезирует полисахариды и гликопротеины, обеспечивает химическую доработку секрета и его транспорт за пределы клетки, а также обеспечивает усложнение структуры белка, синтезированного ЭПС.

Лизосомы и пероксисомы осуществляют переваривание поглощенных клетками веществ, а также расщепление биогенных макромолекул. Они содержат ферменты, обеспечивающие метаболизм различных веществ, в том числе чужеродных (включая лекарственные), и обезвреживание токсичных продуктов обмена. Вакуоли обеспечивают хранение различных веществ, в том числе продуктов обмена. Митохондрии участвуют в генерации и аккумуляции энергии. Рибосомы синтезируют белки. Клеточный центр принимает участие в делении клеток.

Микротрубочки обеспечивают поддерживающую функцию; микрофиламенты выполняют сократительную функцию, принимают участие в образовании межклеточных контактов.

Кроме органелл общего значения существуют специализированные. Например, акросома сперматозоида играет важную роль в механизме оплодотворения; микроворсинки клеток эпителия тонкой кишки способствуют процессам всасывания; микротрубочки рецепторных клеток вкусовых луковиц языка участвуют в кодировании информации о свойствах пищевых веществ; мерцательные реснички клеток эпителия трахеи и бронхиального дерева обеспечивают дренажную функцию дыхательных путей.

Кроме того, в клетке имеются необязательные элементы — включения, которые подразделяют на трофические — питательные: капли жира, гликоген; секреторные: гормоны, биологически активные вещества; экскреторные — подлежащие удалению: мочевина; пигментные — эндогенные (внутренние) — меланин, и экзогенные — поступившие снаружи: пыль, красители (например, в татуировках).

Одно из важных свойств клетки — размножение. Соматические клетки делятся путем митоза, половые — мейоза. В результате митоза клетка получает полный (диплоидный) набор хромосом — 23 пары. В результате мейоза в половых клетках остается половинный (гаплоидный) набор хромосом.

**Химический состав клетки**

В состав клетки входит около 70 химических элементов периодической системы Д. И. Менделеева. В животной клетке около 98 % массы составляют четыре элемента: водород, кислород, углерод и азот, которые относят к макроэлементам. Ниже приведен химический состав животной клетки, % общей массы клетки.

1. Вода - 70
2. Неорганические ионы - 1
3. Белки - 18
4. РНК и ДНК - 1,5
5. Липиды - 5
6. Полисахариды - 2
7. Низкомолекулярные продукты обмена веществ - 2,5

Кроме макроэлементов в клетке присутствуют элементы в десятых и сотых долях процента: натрий, калий, кальций, хлор, фосфор, сера, железо и магний — макро-микроэлементы. Каждый из них выполняет важную функцию в клетке. Например, ионы натрия, калия и хлора обеспечивают проницаемость клеточных мембран для различных веществ и проведение импульса по нервному волокну. Кальций и фосфор участвуют в формировании костной ткани, кроме того, кальций принимает участие в свертывании крови. Железо входит в состав гемоглобина эритроцитов, магний содержится в ряде ферментов.

Остальные элементы (цинк, медь, йод, фтор и др.) содержатся в очень малых количествах — в общей сложности до 0,02 % — микроэлементы. В специализированных клетках они участвуют в образовании биологически активных веществ: цинк входит в состав гормона поджелудочной железы — инсулина; йод — компонент гормонов щитовидной железы. Большинство металлов-микроэлементов входят в состав различных ферментов. Все химические элементы находятся в организме в виде ионов или входят в состав различных неорганических и органических соединений.

**2. Биологические мембраны: современное представление об их строении, химическом составе и функциональном значении.**

Мембраны биологические - функционально активные поверхностные структуры толщиной в несколько молекулярных слоев, ограничивающие цитоплазму и большинство органелл клетки, а также образующие единую внутриклеточную систему канальцев, складок, замкнутых областей.

Биологические мембраны имеются во всех клетках. Мембранные структуры клетки представлены поверхностной (клеточной, или плазматической) и внутриклеточными (субклеточными) мембранами. Название внутриклеточных (субклеточных) мембран обычно зависит от названия ограничиваемых или образуемых ими структур. Так, различают митохондриальные, ядерные, лизосомные мембраны, мембраны пластинчатого комплекса аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума, саркоплазматического ретикулума и др. Толщина биологических мембран — 7—10 нм, но их общая площадь очень велика.

Одним из важных свойств живых клеток является их электрическая возбудимость, т.е. способность возбуждаться в ответ на действие электрического тока. Высокая чувствительность возбудимых тканей к действию слабого электрического тока впервые была продемонстрирована Гальвани в опытах на нервно-мышечном препарате задних лапок лягушки.

Электрические явления, которые возникают в возбудимых тканях, обусловлены электрическими свойствами клеточных мембран.

Наиболее характерным структурным признаком является то, что мембраны всегда образуют замкнутые пространства, и такая микроструктурная организация мембран позволяет им выполнять важнейшие функции.

**Строение и функции клеточных мембран.**

1. Барьерная функция выражается в том, что мембрана при помощи соответствующих механизмов участвует в создании концентрационных градиентов, препятствуя свободной диффузии. К ним относятся механизмы создания потенциала покоя, генерация потенциала действия.

2. Регуляторная функция клеточной мембраны заключается в тонкой регуляции внутриклеточного содержимого и внутриклеточных реакций за счет рецепции внеклеточных биологически активных веществ, что приводит к изменению активности ферментных систем мембраны.

3. Преобразование внешних стимулов неэлектрической природы в электрические сигналы (в рецепторах).

4. Метаболические функции мембран определяются двумя факторами: во-первых, связью большого числа ферментов с мембранами, во-вторых, способностью мембран физически разделять клетку на отдельные отсеки, отграничивая друг от друга метаболические процессы, протекающие в них. Метаболические системы не остаются при этом полностью изолированными.

5. Межклеточные взаимодействия. Определяют взаимодействие клетки с окружающей средой и формирование многоклеточного организма как единого целого. Молекулярно-мембранные аспекты межклеточных взаимодействий касаются прежде всего иммунных реакций, гормонального контроля роста и метаболизма, закономерностей эмбрионального развития.

**3. Плазмолемма, ее значение в жизнедеятельности клетки и строение.**

Любая клетка имеет клеточную мембрану — плазмолемму, которая отделяет ее от внеклеточной среды или окружающих клеток. Молекулярную основу плазмолеммы составляют два слоя фосфолипидов со встроенными в них белками, которые выполняют роль белковых каналов или пор.

Важнейшие функции плазмолеммы — пограничная, биотрансформирующая, транспортная и рецепторная. Пограничная функция заключается в отграничении цитоплазмы от окружающей среды и взаимодействии с ней. Биотрансформирующая функция — это обеспечение биохимических превращений поступающих в клетку веществ, в том числе и лекарственных. Транспортная функция — это перенос через мембрану веществ, необходимых для поддержания постоянства внутренней среды. Рецепторная функция — это способность клетки к избирательному взаимодействию с определенными химически активными веществами (гормонами, медиаторами и др.).

**4. Цитоплазма, ее функционально-химическая характеристика. Морфологические компоненты цитоплазмы, их классификация и значение.**

Цитоплазма участвует в процессах метаболизма и поддержания постоянства внутренней среды клетки. Она содержит постоянно присутствующие структуры, специализированные на выполнении определенных функций, которые называют органеллами (органоидами) и временными компонентами — включениями, образованными в результате накопления продуктов метаболизма. Выделяют органеллы общего назначения и специализированные. В свою очередь, органеллы общего назначения по наличию мембраны классифицируют на мембранные и немембранные. К мембранным органеллам относят: эндоплазматическую сеть, комплекс Гольджи, лизосомы и пероксисомы, вакуоли, митохондрии; немембранными являются рибосомы, клеточный центр, микротрубочки и микрофиламенты, реснички

**5. Органеллы и включения клетки: их строение, классификация, определение.**

Структуры, специализированные на выполнении определенных функций, которые называют органеллами (органоидами) и временными компонентами — включениями, образованными в результате накопления продуктов метаболизма. Выделяют органеллы общего назначения и специализированные. В свою очередь, органеллы общего назначения по наличию мембраны классифицируют на мембранные и немембранные. К мембранным органеллам относят: эндоплазматическую сеть, комплекс Гольджи, лизосомы и пероксисомы, вакуоли, митохондрии; немембранными являются рибосомы, клеточный центр, микротрубочки и микрофиламенты, реснички.

Эндоплазматическая сеть (ЭПС) обеспечивает синтез липидов, углеводов и белков, служит главным депо ионов Ca2+, обеспечивает транспорт веществ внутри клетки. Выделяют две разновидности ЭПС: гранулярную (шероховатую) и агранулярную (гладкую).

На наружной поверхности мембраны агранулярной сети отсутствуют рибосомы, поэтому она имеет гладкую форму. Пластинчатый комплекс (комплекс Гольджи) синтезирует полисахариды и гликопротеины, обеспечивает химическую доработку секрета и его транспорт за пределы клетки, а также обеспечивает усложнение структуры белка, синтезированного ЭПС.

Лизосомы и пероксисомы осуществляют переваривание поглощенных клетками веществ, а также расщепление биогенных макромолекул. Они содержат ферменты, обеспечивающие метаболизм различных веществ, в том числе чужеродных (включая лекарственные), и обезвреживание токсичных продуктов обмена. Вакуоли обеспечивают хранение различных веществ, в том числе продуктов обмена. Митохондрии участвуют в генерации и аккумуляции энергии. Рибосомы синтезируют белки. Клеточный центр принимает участие в делении клеток.

Микротрубочки обеспечивают поддерживающую функцию; микрофиламенты выполняют сократительную функцию, принимают участие в образовании межклеточных контактов.

Кроме органелл общего значения существуют специализированные. Например, акросома сперматозоида играет важную роль в механизме оплодотворения; микроворсинки клеток эпителия тонкой кишки способствуют процессам всасывания; микротрубочки рецепторных клеток вкусовых луковиц языка участвуют в кодировании информации о свойствах пищевых веществ; мерцательные реснички клеток эпителия трахеи и бронхиального дерева обеспечивают дренажную функцию дыхательных путей.

Кроме того, в клетке имеются необязательные элементы — включения, которые подразделяют на трофические — питательные: капли жира, гликоген; секреторные: гормоны, биологически активные вещества; экскреторные — подлежащие удалению: мочевина; пигментные — эндогенные (внутренние) — меланин, и экзогенные — поступившие снаружи: пыль, красители (например, в татуировках).

**6. Ядро клетки: его строение, физико-химические свойства. понятие о эу- и гетерохроматине. Функция всех компонентов ядра. Значение ядра в жизнедеятельности клетки.**

Ядро окружено ядерной оболочкой — кариолеммой. Она отделяет ядро от цитоплазмы, выполняя формообразующую и транспортную функции. Ядро заполнено ядерным соком — кариоплазмой, в состав которой входят белки, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот. В ядре осуществляется хранение, передача и реализация генетической информации, регуляция жизнедеятельности клетки.

Основной единицей хранения генетической информации служит хроматин, состоящий из комплекса ДНК и соответствующий хромосомам, которые не различимы как индивидуальные структуры в интерфазном ядре.

**Эухроматин, активный хроматин** — участки хроматина, сохраняющие деспирализованное состояние элементарных дезоксирибонуклеопротеидных нитей (ДНП) в покоящемся ядре.

**Гетерохроматин** — участки хроматина, находящиеся в течение клеточного цикла в конденсированном (компактном) состоянии. Особенностью гетерохроматиновой ДНК является крайне низкая транскрибируемость.

**7. Понятие о тканях: определение, классификация тканей, их регенерация**

Ткани - система клеток и межклеточного вещества, объединённых общим происхождением, строением и выполняемыми функциями.

Ведущими элементами тканевой системы являются клетки. Кроме клеток, различают клеточные производные и межклеточное вещество.

К производным клеток относят симпласты (например, мышечные волокна, наружная часть трофобласта), синцитий (развивающиеся мужские половые клетки, пульпа эмалевого органа), а также постклеточные структуры (эритроциты, тромбоциты, роговые чешуйки эпидермиса и т. д.).

Межклеточное вещество подразделяют на основное вещество и на волокна. Оно может быть представлено золем, гелем или быть минерализованным.

Среди волокон различают обычно три вида: коллагеновые, ретикулярные, эластические.

КЛАССИФИКАЦИЯ ТКАНЕЙ

Имеется несколько классификаций тканей. Наиболее распространенной является так называемая морфофункциональная классификация, по которой насчитывают четыре группы тканей:

1. эпителиальные ткани;

2. ткани внутренней среды;

3. мышечные ткани;

4. нервная ткань.

К тканям внутренней среды относятся соединительные ткани, кровь и лимфа.

Развитие организма начинается с одноклеточной стадии — зиготы. В ходе дробления возникают бластомеры, но совокупность бластомеров – это еще не ткань. Бластомеры на начальных этапах дробления еще не детерминированы (они тотипотентны). Если отделить их один от другого, - каждый может дать начало полноценному самостоятельному организму – механизм возникновения монозиготных близнецов. Постепенно на следующих стадиях происходит ограничение потенций. В основе его лежат процессы, связанные с блокированием отдельных компонентов генома клеток и детерминацией.

Детерминация – это процесс определения дальнейшего пути развития клеток на основе блокирования отдельных генов.

Понятие «коммитирование» тесно связано с клеточным делением (т.н. коммитирующий митоз).

Коммитирование – это ограничение возможных путей развития вследствие детерминации. Коммитирование совершается ступенчато. Сначала соответствующие преобразования генома касаются крупных его участков. Затем все более детализируются, поэтому вначале детерминируются наиболее общие свойства клеток, а затем и более частные.

Регенерации - восстановления структуры биологического объекта после ее разрушения. Соответственно уровням организации живого различают клеточную (или внутриклеточную), тканевую, органную регенерацию. Предметом общей гистологии является регенерация на тканевом уровне.

Различают регенерацию физиологическую, которая совершается постоянно в здоровом организме, и репаративную — вследствие повреждения. У разных тканей возможности регенерации неодинаковы.

В ряде тканей гибель клеток генетически запрограммирована и совершается постоянно (в многослойном ороговевающем эпителии кожи, в однослойном каемчатом эпителии тонкой кишки, в крови). За счет непрерывного размножения, в первую очередь полустволовых клеток-предшественников, количество клеток в популяции пополняется и постоянно находится в состоянии равновесия. Наряду с запрограммированной физиологической гибелью клеток во всех тканях происходит и незапрограммированная — от случайных причин: травмирования, интоксикаций, воздействий радиационного фона. Хотя в ряде тканей запрограммированной гибели нет, но в течение всей жизни в них сохраняются стволовые и полу-стволовые клетки. В ответ на случайную гибель возникает их размножение и популяция восстанавливается.

У взрослого человека в тканях, где стволовых клеток не остается, регенерация на тканевом уровне невозможна, она происходит лишь на клеточном уровне.

**8. Эпителиальные ткани: общая характеристика, топография, морфофункциональная характеристика, регенерация, функциональное значение, происхождение.**

Эпителий — слой клеток, выстилающий поверхность и полости тела, а также слизистые оболочки внутренних органов, пищевого тракта, дыхательной системы, мочеполовые пути. Кроме того, образует большинство желёз организма. Эпителий делят на покровный и железистый.

**Признаки эпителия:**

1) Эпителий — это пласт клеток, в котором практически нет межклеточного вещества.

2) Эпителий лежит на базальной мембране ( под ней –темная и светлая пластинка)

3) Эпителиальные клетки полярно дифференцированы, то есть базальная и апикальная части клетки различны по строению.

4) Эпителий не имеет собственных кровеносных сосудов, питается диффузно из подлежащей соединительной ткани. Исключение – сосудистая полоска внутреннего уха.

5) Эпителий имеет богатую иннервацию

6) Высокая регенерация. (камбиальные и полустволовые)

7) Эпителий развивается из всех зародышевых листков. Нет единого источника происхождения.

 Структурный элемент- клетки эпителиоциты.

**II. Гистогенетическая** (по Хлопину) основана на источнике эмбрионального развития.

1) Эпидермальный – «эпидермис» — из эктодермы (эпителий кожи)

2) Энетеродермальный – эпителий кишечника – из энтодермы.( желудок, кишки)

3) Целонефродермальный тип – эпителий канальцев почек – из мезодермы.(канальцы почки)

4) Эпендимоглиальный – выстилает спинномозговой канал – из нервоной трубки. (полости мозга)

5) Ангиодермальный – Эндотелий сосудов – из мезенхимы.(сосуды и сердце)

**III. Органоспецефическая** (по Клешову)

1) Кожный — из эктодермы

2) Кишечный – из энтодермы

3) Почечный – из мезодермы

4) Целомический – из мезодермы и мезенхимы

5) Нейроглиальный – из нервной трубки

 **Железистый эпителий** — разновидность эпителиальной ткани, которая состоит из эпителиальных железистых клеток, которые в процессе эволюции приобрели ведущее свойство вырабатывать и выделять секреты. Такие клетки называются секреторными (железистыми) — гландулоцитами. Они имеют точно такую же общую характеристику, как покровный эпителий. Расположен в железах кожи, кишечнике, слюнных железах, железах внутренней секреции и др. Среди эпителиальных клеток находятся секреторные клетки, их 2 вида.

- Экзокринные — выделяют свой секрет во внешнюю среду или просвет органа.

- Эндокринные — выделяют свой секрет непосредственно в кровоток.

**Базальная мембрана.**

Отделяет эпителий от подлежащих элементов. Это мелкозернистая и тонофиламентозная структура толщиной от 20 до 100 нанометров. Состоит из двух слоев. Наружный слой прилежит к эпителию и называется базальная пластинка и имеет толщину от 20 до 40 нанометров. В наружном слое есть светлая зона, образованная аморфным межклеточным веществом, содержащим кальций, и темная зона из гликопротеинового матрикса (она хорошо проявляется в ШИК-реакции). Содержит ламинин и фибронектин. Базальная пластинка это продукт синтеза эпителиоцитов. Внутренний слой граничит непосредственно с соединительной тканью, является продуктом синтеза клеток соединительной ткани. Это войлокообразное сплетение волокон из коллагена 4 типа и якорных волокон (коллагена 7 типа).

**Физиологическая и репаративная регенерация эпителиев.**

Физиологическая регенерация представляет собой процесс обновления функционирующих структур организма. Благодаря физиологической регенерации поддерживается структурный гомеостаз и обеспечивается возможность постоянного выполнения органами их функций. С общебиологической точки зрения, физиологическая регенерация, как и обмен веществ, является проявлением такого важнейшего свойства жизни, как самообновление.

Примером физиологической регенерации на внутриклеточном уровне являются процессы восстановления субклеточных структур в клетках всех тканей и органов. Значение ее особенно велико для так называемых «вечных» тканей, утративших способность к регенерации путем деления клеток. В первую очередь это относится к нервной ткани.

Примерами физиологической регенерации на клеточном и тканевом уровнях являются обновление эпидермиса кожи, роговицы глаза, эпителия слизистой кишечника, клеток периферической крови и др.

Репаративная регенерация наступает после повреждения ткани или органа.

**9. Строение однослойных эпителиев (мезотелий, эпителий почечных ка­нальцев, многорядный мерцательный эпителий трахеи).**

**Однослойные однорядные эпителии.**

По форме клеток могут быть плоскими, кубическими, призматическими.

Однослойный плоский эпителий представлен в организме мезотелием и эндотелием.

Мезотелий покрывает серозные оболочки (листки плевры, брюшины, околосердечной сумки). Клетки мезотелия плоские. На свободной поверхности клетки имеются микроворсинки. Через мезотелий происходят выделение и всасывание серозной жидкости. Благодаря его гладкой поверхности легко осуществляется скольжение внутренних органов. Мезотелий препятствует образованию спаек между органами брюшной или грудной полостей, развитие которых возможно при нарушении его целостности.

Эндотелий выстилает кровеносные и лимфатические сосуды, а также камеры сердца. Он представляет собой пласт плоских клеток — эндотелиоцитов, лежащих в один слой на базальной мембране. Эндотелий, располагаясь в сосудах на границе с лимфой или кровью, участвует в обмене веществ и газов между ними и другими тканями. При его повреждении возможны изменение кровотока в сосудах и образование в их просвете сгустков крови — тромбов.

Однослойный кубический эпителий выстилает часть почечных канальцев. Эпителий почечных канальцев выполняет функцию обратного всасывания (или реабсорбции) ряда веществ из первичной мочи в кровь.

Однослойный призматический эпителий характерен для среднего отдела пищеварительной системы. Он выстилает внутреннюю поверхность желудка, тонкой и толстой кишки, желчного пузыря, ряда протоков печени и поджелудочной железы. Эпителиальные клетки связаны между собой с помощью десмосом, щелевых коммуникационных соединений, по типу замка, плотных замыкающих соединений.

В желудке в однослойном призматическом эпителии все клетки являются железистыми, продуцирующими слизь, которая защищает стенку желудка от грубого влияния комков пищи и переваривающего действия желудочного сока.

В тонкой кишке эпителий однослойный призматический каемчатый, активно участвующий в пищеварении. Он покрывает в кишке поверхность ворсинок и, в основном, состоит из каемчатых эпителиоцитов, среди которых располагаются железистые бокаловидные клетки. Каемка эпителиоцитов образована многочисленными микроворсинками, покрытыми гликокаликсом. В нем и мембране микроворсинок находятся ансамбли ферментов, которые осуществляют мембранное пищеварение — расщепление (гидролиз) веществ пищи до конечных продуктов и всасывание их (транспорт через мембрану и цитоплазму эпителиоцитов) в кровеносные и лимфатические капилляры подлежащей соединительной ткани.

**Регенерация покровных эпителиев**

Покровный эпителий, занимая пограничное положение, постоянно испытывает влияние внешней среды, поэтому эпителиальные клетки сравнительно быстро изнашиваются и погибают. Источником их восстановления являются стволовые клетки эпителия. Они сохраняют способность к делению в течение всей жизни организма. Размножаясь, часть вновь образованных клеток вступает в дифференцировку и превращается в эпителиоциты, подобные утраченным. Стволовые клетки в многослойных эпителиях находятся в базальном слое, в многорядных эпителиях к ним относятся базальные клетки, в однослойных эпителиях они располагаются в определенных участках: например, в тонкой кишке — в эпителии крипт, в желудке — в эпителии ямок, и шеек собственных желез. Высокая способность эпителия к физиологической регенерации служит основой для быстрого восстановления его в патологических условиях.

С возрастом в покровном эпителии наблюдается ослабление процессов обновления.

**Многорядные** (псевдомногослойные) эпителии выстилают воздухоносные пути — носовую полость, трахею, бронхи, а также ряд других органов. В воздухоносных путях многорядный эпителий является реснитчатым, и содержит клетки, различные по форме и выполняемой функции.

Базальные клетки низкие, лежат на базальной мембране в глубине эпителиального пласта. Они относятся к камбиальным клеткам, которые делятся и дифференцируются в реснитчатые и бокаловидные клетки, участвуя, таким образом, в регенерации эпителия.

Реснитчатые (или мерцательные) клетки высокие, призматической формы. Их апикальная поверхность покрыта ресничками. Бокаловидные клетки секретируют на поверхность эпителия слизь.

**10. Строение многослойных эпителиев (многослойный плоский неороговевающий эпителии роговицы, эпидермис, переходный эпителий).**

**Многослойный** - с базальной мембраной взаимодействует только нижний слой клеток.

Многослойный плоский неороговевающий эпителий покрывает снаружи роговицу глаза, выстилает полости рта и пищевода. В нем различают три слоя: базальный, шиповатый (промежуточный) и плоский (поверхностный). Базальный слой состоит из эпителиоцитов призматической формы, располагающихся на базальной мембране. Среди них имеются стволовые клетки, способные к митотическому делению. За счет вновь образованных клеток, вступающих в дифференцировку, происходит смена эпителиоцитов вышележащих слоев эпителия. Шиповатый слой состоит из клеток неправильной многоугольной формы. В базальном и шиповатом слоях в эпителиоцитах хорошо развиты тонофибриллы (пучки тонофиламентов из белка кератина), а между эпителиоцитами — десмосомы и другие виды контактов. Верхние слои эпителия образованы плоскими клетками. Заканчивая свой жизненный цикл, последние отмирают и отпадают (слущиваются) с поверхности эпителия.

Многослойный плоский ороговевающий эпителий покрывает поверхность кожи, образуя ее эпидермис, в котором происходит процесс ороговения. В эпидермисе различают несколько слоев клеток — базальный, шиповатый, зернистый, блестящий и роговой. Последние три слоя особенно сильно выражены в коже ладоней и подошв.

Основную часть клеток в слоях эпидермиса составляют кератиноциты, которые по мере дифференцировки перемещаются из базального слоя в вышележащие слои. Базальный слой эпидермиса состоит из призматических по форме кератиноцитов, в цитоплазме которых синтезируется кератиновый белок, формирующий тонофиламенты. Здесь же находятся стволовые клетки дифферона кератиноцитов. Поэтому базальный слой называют ростковым, или герминативным.

Кроме кератиноцитов, в эпидермисе находятся другие диффероны клеток — меланоциты (или пигментные клетки), внутриэпидермальные макрофаги (или клетки Лангерганса), лимфоциты и некоторые другие.

Роговой слой эпидермиса состоит из плоских многоугольной формы кератиноцитов — роговых чешуек, имеющих толстую оболочку с кератолинином и заполненных кератиновыми фибриллами, упакованными в аморфном матриксе.

**Переходный эпителий**

Этот вид многослойного эпителия типичен для мочеотводящих органов — лоханок почек, мочеточников, мочевого пузыря, стенки которых подвержены значительному растяжению при заполнении мочой. В нем различают несколько слоев клеток — базальный, промежуточный, поверхностный.

Базальный слой образован мелкими почти округлыми (темными) камбиальными клетками. В промежуточном слое располагаются клетки полигональной формы. Поверхностный слой состоит из очень крупных, нередко дву- и трехъядерных клеток, имеющих куполообразную или уплощенную форму в зависимости от состояния стенки органа. При растяжении стенки вследствие заполнения органа мочой эпителий становится более тонким и его поверхностные клетки уплощаются. Во время сокращения стенки органа толщина эпителиального пласта резко возрастает. При этом некоторые клетки в промежуточном слое как бы «выдавливаются» кверху и принимают грушевидную форму, а расположенные над ними поверхностные клетки — куполообразную форму. Между поверхностными клетками обнаружены плотные контакты, имеющие значение для предотвращения проникновения жидкости через стенку органа (например, мочевого пузыря).

**День 15 (06.06.2020 г)**

**20. Хрящевые ткани: общая характеристика, классификация, строение. Хрящ как орган: строение и рост гиалинового хряща, строение эластического хряща.**

Хрящевые ткани (textus cartilaginei) отличаются упругостью и прочностью, что связано с положением этой ткани в организме. Хрящевая ткань входят в состав органов дыхательной системы, суставов, межпозвоночных дисков.

Как и в других тканях, в хрящевой ткани выделяют клетки и межклеточное вещество. Главные клеточные элементы – хондробласты и хондроциты. Межклеточного вещества в хрящевой ткани больше, чем клеток. Оно отличается гидрофильностью и упругостью. Именно с упругостью межклеточного вещества связана опорная функция хрящевых тканей.

Хрящевая ткань значительно гидратирована, - в свежей ткани содержится до 80% воды. Более половины объема «сухого» вещества хрящевой ткани составляет фибриллярный белок коллаген. В хрящевой ткани остутствуют сосуды – питательные вещества диффундируют из окружающих тканей.

**Классификация**

Различают три вида хрящевой ткани:

- Гиалиновую,

- Эластическую,

- Волокнистую.

Такое подразделение хрящевых тканей основано на структурно-функциональных особенностях строения их межклеточного вещества, степени содержания и соотношения коллагеновых и эластических волокон.

**Краткая характеристика клеток хрящевой ткани**

Хондробласты – небольшие уплощенные клетки, способные делиться и синтезировать межклеточное вещество. Выделяя компоненты межклеточного вещества, ходробласты как бы «замуровывают» себя в нем, - превращаются в хондроциты. Происходящий при этом рост хряща называется периферическим, или аппозиционным, - т.е. путем «наложения» новых слоев хряща.

Хондроциты - имеют больший размер и овальную форму. Они лежат в особых полостях межклеточного вещества – лакунах. Хондроциты часто образуют т.н. изогенные группы из 2-6 клеток, которые произошли из одной клетки. При этом некоторые хондроциты сохраняют способность к делению, а другие активно синтезируют компоненты межклеточного вещества. За счёт деятельности хондроцитов происходит увеличение массы хряща изнутри - интерстициальный рост.

**Краткая характеристика межклеточного вещества хрящевой ткани**

Межклеточное вещество состоит из волокон и основного, или аморфного, вещества. Большинство волокон представлено коллагеновыми волокнами, а в эластических хрящах – еще и эластическими волокнами. Основное вещество содержит воду, органические вещества и минеральные вещества.

Органический компонент представлен протеогликановыми агрегатами (ПГА) и гликопротеинами (ГП). В основе протеогликанового агрегата лежит длинная нить гиалуроновой кислоты. С помощью небольших глобулярных белков с гиалуроновой кислотой связаны линейные фибриллярные пептидные цепи т.н. корового белка (core protein). В свою очередь, от коровых белков отходят олигосахаридные ветви – гликозаминогликаны (ГАГ). Соединения гликозаминогликанов с коровыми белками имеют собственное название – протеогликаны (ПГ).

Протеогликановые агрегаты обладают высокой гидрофильностью, т.е. связывают большое количество воды и обеспечивают тем самым высокую упругость хряща. При этом они сохраняют проницаемость для низкомолекулярных метаболитов.

**Эластический хрящ**

Локализация: ушная раковина, хрящи гортани (надгортанный, рожковидные, клиновидные, а также голосовой отросток у каждого черпаловидного хряща), евстахиевой трубы. Этот вид ткани необходим для тех участков органов, которые способны менять свой объем, форму и обладают обратимой деформацией.

Строение: клетки хряща хондроциты (описаны выше) и межклеточное вещество, состоящее из эластических волокон (до 95%) волокон и аморфного вещества. Для визуализации используются красители, выявляющие эластические волокна, например, орсеин.

**21. Мышечные ткани: общая морфо-функциональная характеристика, классификация. Строение поперечно-полосатой мышцы скелетного типа, регенерация, строение скелетной мышцы как органа.**

Мышечная ткань осуществляет двигательные функции организма. Во всех сократительных элементах мышечных тканей функционирует актомиозиновый хемомеханический преобразователь.

У части гистологических элементов мышечной ткaни в микроскоп видны сократительные единицы — саркомеры. Это обстоятельство позволяет различать два типа мышечных тканей. Один из них — поперечнополосатая (скелетная и сердечная) и второй — гладкая. Сократительную функцию скелетной мышечной ткани (произвольная мускулатура) контролирует нервная система (соматическая двигательная иннервация). Непроизвольные мышцы (сердечная и гладкая) имеют вегетативную двигательную иннервацию, а также развитую систему гуморального контроля их сократительной активности. Для гладко мышечных клеток (ГМК) характерна выраженная физиологическая и репаративная регенерация. В составе же скелетных мышечных волокон присутствуют стволовые клетки (клетки-сателлиты), поэтому скелетная мышечная ткань потенциально способна к регенерации. В сердечной мышечной ткани стволовые клетки отсутствуют; по этой причине регенерация кардиомиоцитов невозможна.

Мышечные клетки обычно называют мышечными волокнами, потому что они постоянно вытянуты в одном направлении. Сократимость у мышечных клеток достигла наибольшего развития: они состоят из сокращающихся элементов, называемых миофибриллами, расположенных вдоль оси длинной волокна и придающих ему продольную исчерченность. Это характерно для всех видов мышечной ткани. Миофибриллы некоторых типов мышечной ткани состоят из перемежающихся плотноуложенных темных и светлых полос. В результате волокно имеет поперечную исчерченность и называется поперечно-полосатым мышечным волокном.

Классификация мышечных тканей проводится на основании строения ткани (гистологически): по наличию или отсутствию поперечной исчерченности, и на основании механизма сокращения - произвольного (как в скелетной мышце) или непроизвольного (гладкая или сердечная мышцы), т.е. по физиологическому признаку. Плазматическая мембрана мышечного волокна называется сарколеммой, и в зависимости от типа мышечной ткани она имеет различную степень развития.

Цитоплазма клеток мышечной ткани называется саркоплазмой, во всех трех видах мышечной ткани цитоплазма состоит из сократительных белков - актина и миозина и богата митохондриями, содержащими ферменты для активного метаболизма и сократительных движений мышечного волокна.

**Классификация мышечной ткани.**

(А) По гистологическому признаку:

- Неисчерченная:

Гладкая мышечная ткань

- Исчерченная:

Поперечно-полосатая мышечная ткань

Сердечная мышца

(Б) По физиологическому признаку:

- Непроизвольная: Гладкая мышечная ткань

Сердечная мышца

- Произвольная:

Поперечно-полосатая мышечная ткань

**Скелетная мышца** состоит из поперечнополосатых мышечных волокон. Значительный объём волокон занимают миофибриллы. Расположение светлых и тёмных дисков в параллельных друг другу миофибриллах совпадает, что приводит к появлению поперечной исчерченности. Структурная единица миофибрилл — саркомер, сформированный из толстых и тонких нитей.

**22. Гладкая мышечная ткань: общая характеристика, топография, строение, регенерация.**

Основной гистологический элемент гладкомышечной ткани — гладкомышечная клетка (ГМК), способная к гипертрофии и регенерации, а также к синтезу и секреции молекул межклеточного матрикса. ГМК в составе гладких мышц формируют мышечную стенку полых и трубчатых органов, контролируя их моторику и величину просвета. Регуляцию сократительной активности ГМК осуществляют двигательная вегетативная иннервация и множество гуморальных факторов. В ГМК отсутствует поперечная исчерченность, т.к. миофиламенты — тонкие (актиновые) и толстые (миозиновые) нити — не образуют миофибрилл.

Гладкомышечная клетка. Морфофункциональная единица гладкой мышечной ткани — ГМК. Заострёнными концами ГМК вклиниваются между соседними клетками и образуют мышечные пучки, в свою очередь формирующие слои гладкой мускулатуры. В волокнистой соединительной ткани между миоцитами и мышечными пучками проходят нервы, кровеносные и лимфатические сосуды. Встречаются и единичные ГМК, например, в субэндотелиальном слое сосудов. Их форма — вытянутая веретеновидная, часто отростчатая. Длина ГМК от 20 мкм до 1 мм. Овальное ядро локализовано центрально. В саркоплазме у полюсов ядра расположены хорошо выраженный комплекс Гольджи, многочисленные митохондрии, свободные рибосомы, саркоплазматический ретикулум. Миофиламенты ориентированы вдоль продольной оси клетки. Базальная мембрана, окружающая ГМК, содержит протеогликаны, коллаген типа III и V.

**Сократительный аппарат.** Стабильные актиновые нити ориентированы преимущественно по продольной оси ГМК и прикрепляются к плотным тельцам. Сборку толстых (миозиновых) нитей и взаимодействие актиновых и миозиновых нитей активируют ионы кальция, поступающие из депо Са2+. Непременные компоненты сократительного аппарата — кальмодулин (Са2+-связывающий белок), киназа и фосфатаза лёгкой цепи гладкомышечного миозина. В ГМК, как и в других мышечных тканях, работает актомиозиновый хемомеханический преобразователь, но АТФазная активность миозина в гладкомышечной ткани приблизительно на порядок ниже активности АТФазы миозина поперечнополосатой мышцы. Медленное образование и разрушение актин-миозиновых мостиков требуют меньшего количества АТФ. Отсюда, а также из факта лабильности миозиновых нитей (их постоянная сборка и разборка при сокращении и расслаблении соответственно) вытекает важное обстоятельство — в ГМК медленно развивается и длительно поддерживается сокращение. При поступлении сигнала к ГМК (через рецепторы плазмолеммы и щелевые контакты) сокращение ГМК запускают ионы кальция, поступающие из кальциевых депо.

**23. Нервная ткань: ее основные компоненты. Нейроны: морфологическая и функциональная характеристика. Классификация(морфологическая и функциональная). Нейроглия: ее разновидности, функции различных представителей глии.**

Нервная ткань — это система взаимосвязанных нервных клеток и нейроглии, обеспечивающих специфические функции восприятия раздражении, возбуждения, выработки импульса и передачи его. Она является основой строения органон нервной системы, обеспечивающих регуляцию всех тканей и органов, их интеграцию в организме и связь с окружающей средой. Нервные клетки — основные структурные компоненты нервной ткани, выполняющие специфическую функцию. Нейроглия обеспечивает существование и функционирование нервных клеток, осуществляя опорную, трофическую, разграничительную, секреторную и защитную функции.

**Развитие нервной ткани**

Нервная ткань развивается из дорсальной эктодермы. У 18-дневного эмбриона человека эктодерма по средней линии спины дифференцируется и утолщается, формируя нервную пластинку, латеральные края которой приподнимаются, образуя нервные валики, а между валиками формируется нервный желобок. Передний конец нервной пластинки расширяется, образуя позднее головной мозг.Из нервной трубки в дальнейшем формируются нейроны и макроглия центральной нервной системы. Нервный гребень дает начало нейронам чувствительных (сенсорных) и автономных ганглиев, клеткам мягкой мозговой и паутинной оболочек мозга и некоторым видам глии: нейролеммоцитам (шванновским клеткам), клеткам-сателлитам ганглиев, клеткам мозгового вещества надпочечников, меланоцитам кожи, части клеток APUD-системы, сенсорным клеткам каротидных телец и др.

Нервная трубка на ранних стадиях эмбриогенеза представляет собой многорядный нейроэпителий, состоящий из вентрикулярных, или нейроэпителиальных клеток. В дальнейшем в нервной трубке дифференцируется 4 концентрических зоны:

- внутренняя - вентрикулярная (или эпендимная) зона,

- вокруг нее – субвентрикулярная зона,

- затем промежуточная (или плащевая, или же мантийная, зона) и, наконец,

- наружная - краевая (или маргинальная) зона нервной трубки

Регенерация нервной ткани у млекопитающих животных и человека затруднена, так как в процессе эмбрионального гистогенеза все нейробласты дифференцируются в нервные клетки. В связи с отсутствием в нервной ткани камбиальных элементов новые нервные клетки не образуются. Регенерировать могут лишь отростки нервных клеток, не утратившие после повреждения связи с перикарионом. Если перерезать нерв, т. е. отростки нервных клеток, то вначале наблюдается дегенерация периферических нервных отростков, утративших связь с перикарионом нейрона, после чего наступает регенерация отростков нервной клетки, связанных с перикарионом. После того как нерв перерезан или разорван, нервные отростки, утратившие связь с перикарионом, истончаются во многих местах и распадаются на фрагменты, а спустя 10 суток.

**Нейроны, или нейроциты** (neuronum, neurocytus), — специализированные клетки нервной системы, ответственные за рецепцию, обработку стимулов, проведение импульса и влияние на другие нейроны, мышечные или секреторные клетки. Нейроны выделяют нейромедиаторы и другие вещества, передающие информацию.

В зависимости от функции в рефлекторной дуге различают рецепторные (чувствительные, афферентные), ассоциативные и эфферентные (эффекторные) нейроны. Афферентные нейроны воспринимают импульс, эфферентные передают его на ткани рабочих органов, побуждая их к действию, а ассоциативные осуществляют связь между нейронами. Нейроны отличаются большим разнообразием форм и размеров. Обычно нейроны состоят из тела (перикариона) и отростков: аксона и различного числа ветвящихся дендритов. По количеству отростков различают униполярные нейроны, имеющие только аксон (у высших животных и человека обычно не встречаются), биполярные, имеющие аксон и один дендрит, и мультиполярные, имеющие аксон и много дендритов. Иногда среди биполярных нейронов встречается псевдоуниполярный, от тела которого отходит один общий вырост — отросток, разделяющийся затем на дендрит и аксон. Псевдоуниполярные нейроны присутствуют в спинальных ганглиях, биполярные — в органах чувств.

В нейроне различают часть, специализированную на рецепции стимулов, дендриты и тело — перикарион, трофическую часть (тело нейрона) и проводящую, передающую импульс (аксон).

Дендриты представляют собой истинные выпячивания тела клетки. Они содержат те же органеллы, что и тело клетки: глыбки хроматофильной субстанции (гранулярный эндоплазматический ретикулум и полисомы), митохондрии, большое количество нейротубул (микротрубочек) и нейрофиламентов. За счет дендритов рецепторная поверхность нейрона увеличивается в 1000 и более раз.

Таким образом, общими функциями нейронов ЦНС являются прием, кодирование, хранение информации и выработка нейромедиатора. Нейроны, с помощью многочисленных синапсов, получают сигналы в виде постсинаптических потенциалов. Затем перерабатывают эту информацию и формируют определенную ответную реакцию. Следовательно, они выполняют и интегративную, т.е. объединительную функцию.

**Нейроглия,** или просто глия — сложный комплекс вспомогательных клеток нервной ткани, общный функциями и, частично, происхождением (исключение — микроглия).

Глиальные клетки составляют специфическое микроокружение для нейронов, обеспечивая условия для генерации и передачи нервных импульсов, а также осуществляя часть метаболических процессов самого нейрона.

**Нейроны** — высокоспециализированные клетки, существующие и функционирующие в строго определенной среде. Такую среду им обеспечивает нейроглия (neuroglia). Нейроглия выполняет следующие функции: опорную, трофическую, разграничительную, поддержание постоянства среды вокруг нейронов, защитную, секреторную. Различают глию центральной и периферической нервной системы.

В эмбриогенезе глиоциты (кроме микроглиальных клеток) дифференцируются из глиобластов, которые имеют два источника — медуллобласты нервной трубки и ганглиобласты ганглиозной пластинки. Оба эти источника на ранних этапах образовались из эктодермы.

Глия центральной нервной системы. Клетки глии центральной нервной

системы делятся на макроглию (глиоциты) и микроглию. Макроглия развивается из глиобластов нервной трубки. К макроглии относятся эпендимоциты(желудочки головного мозга), астроциты(опорная и разграничительная ф-я, в сером вве ЦНС, а волокнистые в белом) и олигодендроглиоциты(и в сером и в белом вве).

Микроглия-это резидентные макрофаги центральной нервной системы (ЦНС).Микроглия также подавляет патогены при помощи выделения цитотоксических веществ.

Астроциты – звездчатые клетки, многочисленные отростки которых ветвятся и окружают другие структуры мозга. Астроциты есть только в ЦНС и анализаторах – производных нервной трубки.

**Виды астроцитов:** волокнистые и протоплазматические астроциты.

Волокнистые астроциты имеют многочисленные, длинные, тонкие, слабо или совсем не ветвящиеся отростки. В основном присутствуют в белом веществе мозга.

Протоплазматические астроциты отличаются короткими, толстыми и сильно ветвящимися отростками. Имеются преимущественно в сером веществе мозга. Астроциты располагаются между телами нейронов, немиелинизированной и миелинизированной частями нервных отростков, синапсами, кровеносными сосудами, подэпендимными пространствами, изолируя и в то же время структурно связывая их.Астроциты имеют относительно крупные светлые ядра, со слабо развитым ядрышковым аппаратом. Цитоплазма слабо оксифильная, в ней слабо развита аЭПС и грЭПС, комплекс Гольджи. Митохондрий мало, они небольших размеров. Цитоскелет развит умеренно в протоплазматических и хорошо – в волокнистых астроцитах. Между клетками значительное число щелевидных и десмосомоподобных контактов.

Основные функции астроцитов: участие в гематоэнцефалическом и ликворогематическом барьерах (своими отростками покрывают капилляры, поверхности мозга и участвуют в транспорте веществ от сосудов к нейронам и наоборот), в связи с этим выполняют защитную, трофическую, регуляторную функции; фагоцитоз погибших нейронов, секреция биологически активных веществ: ФРФ, ангиогенные факторы, ЭФР, интерлейкин–I, простагландины.

Олигодендроциты – клетки с небольшим числом отростков, способные к образованию миелиновых оболочек вокруг тел и отростков нейронов.Ядра олигодендроцитов мелкие, округлые, темноокрашенные, отростки тонкие, не ветвятся или слабо ветвятся. На электроннооптическом уровне в цитополазме хорошо развиты органеллы, особенно синтетический аппарат, слабо развит цитоскелет.

Эпендимоциты, или эпендимная глия – клетки низкопризматической формы, образующие непрерывный пласт, покрывающий полости мозгаВ цитоплазме эпендимоцитов обнаруживаются митохондрии, умеренно развитый синтетический аппарат, хорошо представлен цитоскелет, имеется значительное количество трофических и секреторных включений.Основные функции эпендимоцитов: секреторная (синтез ликвора), защитная (обеспечение гемато-ликворного барьера), опорная, регуляторная (предшественники таницитов направляют миграцию нейробластов в нервной трубке в эмбриональном периоде развития).

**24. Нервные волокна: понятие, классификация, функции. Строение миелиновых и безмиелиновых нервных волокон.**

Нервное волокно состоит из отростка нейрона – осевого цилиндра (дендрита или аксона) и оболочки олигодендроцита или его разновидностей.

**Виды нервных волокон:**

1) В зависимости от того, как произошло образование оболочки, нервные волокна подразделяются на миелиновые и безмиелиновые.

В периферической нервной системе нервные волокна окружают леммоциты. Один леммоцит связан с одним нервным волокном. В центральной нервной системе отростки нейронов окружают олигодендроциты. Каждый олигодендроцит участвует в формировании нескольких нервных волокон.

Миелинизация волокон осуществляется путем удлинения и «наворачивания» мезаксона вокруг отростка нервной клетки (в периферической нервной системе) или удлинения и вращения отростка олигодендроцита вокруг осевого цилиндра в ЦНС.

 Миелиновые (мякотные) волокна в периферической нервной системе имеют в своём составе один отросток нейрона, окружённый удлинённой дупликутурой леммоцита (мезаксон). В миелиновом волокне мезаксон многократно оборачивается вокруг осевого цилиндра, формируя многократные витки мембраны – миелин. Зоны разрыхления миелина (проникновения цитоплазмы леммоцита) называются насечками (Шмидта-Лантермана). Каждый леммоцит образует сегмент волокна, участки границ соседних клеток немиелинизированы и называются перехватами Ранвье, таким образом, по длине волокна миелиновая оболочка имеет прерывистый ход. Миелиновая оболочка является биологическим изолятором. Распространение деполяризации в миелиновом волокне осуществляется скачками от перехвата к перехвату.

Безмиелиновые (безмякотные) волокна в периферической нервной системе состоят из одного или нескольких осевых цилиндров, погружённых в цитолемму окружающего их леммоцита. Мезаксон (дупликатура мембраны) короткий. Передача возбуждения в безмиелиновых волокнах происходит по поверхности нерва через изменение поверхностного заряда.

В зависимости от характера проводимого по ним сигнала, нервные волокна подразделяют на двигательные вегетативные, чувствительные и двигательные соматические.

Нервные волокна классифицируются по:

- длительности потенциала действия;

- строению (диаметру) волокна;

- скорости проведения возбуждения.

**Выделяют следующие группы нервных волокон:**

-группа А (альфа, бета, гамма, дельта) - самый короткий потенциал действия, самая толстая миелиновая оболочка, самая высокая скорость проведения возбуждения;

-группа В - миелиновая оболочка менее выражена;

-группа С - без миелиновой оболочки.

**25. Нервная система. Общая характеристика и функциональная классификация. Спинномозговые узлы: строение и функция.**

Нервная система (НС) – это совокупность специальных структур, объединяющих и координирующих деятельность всех органов и систем организма в постоянном взаимодействии с внешней средой.

**Функции нервной системы:**

1. Координирует и регулирует деятельность всех органов и систем, обеспечивая функционирование организма как единого целого.

2. Осуществляет адаптацию организма к изменениям окружающей обстановки.

3. Осуществляет психическую деятельность, возникающую на основе физиологических процессов ощущения, восприятий и мышления.

Структурной и функциональной единицей НС является нейрон, или нервная клетка. Нейрон состоит из тела и отростков двух типов: коротких ветвящихся дендритов и длинного отростка — аксона. В теле нейрона протекают обменные процессы, вырабатывается энергия, необходимая для нормального функционирования нервной клетки. Дендриты – короткие, ветвящиеся, отростки, не выходящие за пределы ЦНС. По ним нервный импульс идет от рецепторов или других нейронов к телу клетки. Аксон – единственный длинный отросток нервной клетки, который выходит за пределы ЦНС и составляет периферическую нервную систему. Аксон покрыт миелиновой оболочкой, создающей оптимальные условия для проведения сигналов. Аксон, покрытый оболочками, называется нервным волокном. Аксон проводит, нервный импульс от тела клетки на периферию, т.е. от одного нейрона к другому или к рабочему органу.

**Основные свойства нейронов** – раздражимость и возбудимость.

Нервные клетки передают возбуждение к другой нервной клетке или рабочей клетке посредством синапса. Синапс образован двумя мембранами – пресинаптической и постсинаптической, между которыми находится синаптическая щель. Возбуждение через синапсы передается химическим путем с помощью медиаторов (ацетилхолин, адреналин и норадреналин).

Нервные волокна объединяются в нервы. Нервы, передающие возбуждение из ЦНС к рабочим органам, называются двигательными или центробежными нервами. Нервы, передающие возбуждение в ЦНС с рабочих органов называются чувствительными или центростремительными. Большинство нервов являются смешанными.

**Классификация нервной системы.**

Структурно (топографически) нервную систему разделяют на центральный и периферический отделы.

Центральную нервную систему (ЦНС) образуют головной мозг и спинной. Серое вещество ЦНС образовано скоплением тел нейронов – нервные центры, а белое — их отростками.

**Периферическая нервная система образована:**

- нервами, которые отходят от головного и спинного мозга (12 пар черепно-мозговые нервы и 31 пара спинномозговые);

- нервными узлами — скоплениями нервных клеток вне спинного и головного мозга;

- нервными окончаниями.

Функционально, нервную систему разделяют на соматическую и вегетативную.

**Спинномозговой узел**

Является продолжением (частью) заднего корешка спинного мозга. По функции – чувствительные.

Снаружи покрыт соединительнотканной капсулой. Внутри – соединительнотканные прослойки с кровеносными и лимфатическими сосудами, нервными волокнами (вегетативными). В центре – миелиновые нервные волокна псевдоуниполярных нейронов, расположенных по периферии спинномозгового узла.

Псевдоуниполярные нейроны имеют крупное округлое тело, крупное ядро, хорошо развитые органеллы, особенно белоксинтезирующий аппарат. От тела нейрона отходит длинный цитоплазматический вырост – это часть тела нейрона, от которого отходят один дендрит и один аксон. Дендрит – длинный, образует нервное волокно, которое идет в составе периферического смешанного нерва на периферию. Чувствительные нервные волокна заканчиваются на периферии рецептором, т.е. чувствительным нервным окончанием. Аксоны - короткие, образуют задний корешок спинного мозга. В задних рогах спинного мозга аксоны формируют синапсы со вставочными нейронами. Чувствительные (псевдоуниполярные) нейроны составляют первое (афферентное) звено соматической рефлекторной дуги. Все тела клеток расположены в ганглиях.

**26. Спинной мозг. Строение и функция.**

Спинной мозг (medulla spinalis) представляет собой тяж длиной около 43-45 см. Он заполняет полость позвоночного канала и имеет сегментарное строение, соответствующее строению позвоночника.

В центре спинного мозга расположено серое вещество – скопление тел нервных клеток в виде передних и задних рогов (на поперечном разрезе серое вещество имеет вид бабочки). Они выполняют рефлекторную функ­цию спинного мозга. Серое вещество окружено белым веществом, образованное нервными волок­нами и выполняет проводниковую роль.

**Основные функции спинного мозга:**

1. Рефлекторная. В спинном мозге находятся рефлекторные центры мышц туловища, конечностей и шеи, что позволяет реализовать все двигательные рефлексы тела, а также рефлексы внутренних органов, терморегуля­ции и т.д.

2. Проводниковая.

Деятельность спинного мозга подчинена регуляции вышележащих отделов ЦНС, т.е. головному мозгу.

В течение первых трех месяцев внутриутробной жизни спинной мозг занимает позвоночный канал на всю его длину. В дальнейшем позвоночник растет быстрее, чем спинной мозг. Поэтому нижний конец спинного мозга поднимается в позвоночном канале. У новорожденного ребенка нижний конец спинного мозга находится на уровне III поясничного позвонка, у взрослого человека – на уровне II поясничного позвонка.

Возрастные особенности спинного мозга. Спинной мозг новорожденного имеет длину 14 см. К 2 годам длина спинного мозга достигает 20 см, а к 10 годам, по сравнению с периодом новорожденности, удваивается. Быстрее всего растут грудные сегменты спинного мозга. Масса спинного мозга у новорожденного составляет около 5,5 г, у детей 1-го года – около 10 г. К 3 годам масса спинного мозга превышает 13 г, к 7 годам равна примерно 19 г. У новорожденного центральный канал шире, чем у взрослого. Уменьшение его просвета происходит главным образом в течение 1-2 годов, а также в более поздние возрастные периоды, когда наблюдается увеличение массы серого и белого вещества. Объем белого вещества спинного мозга возрастает быстро, особенно за счет собственных пучков сегментарного аппарата, формирование которого происходит в более ранние сроки по сравнению со сроками формирования проводящих путей.

**27. Сердечно-сосудистая система: общая морфологическая и функциональная характеристика. Классификация сосудов, общий план строения стенки сосудов. Основные компоненты каждой оболочки.**

Сердечно - сосудистая система – это система органов крово- и лимфообращения. Эта система обеспечивает в организме непрерывное движение крови и лимфы и выполняет в организме транспортную функцию, доставляя к органам и тканям питательные вещества, кислород, биологически активные вещества и выносит от них продукты обмена. Вместе с нервной системой сердечно-сосудистая система объединяет и координирует работу органов, систем органов и организма в целом.

По характеру циркулирующей в сосудах жидкости всю сердечно-сосудистую систему подразделяют на:

- Кровеносную систему (в сосудах циркулирует кровь);

- Лимфатическую систему (в сосудах циркулирует лимфа).

Сердце и кровеносные сосуды образуют замкнутую систему, по которой кровь движется благодаря сокращениям сердечной мышцы.

Различают крупные кровеносные сосуды: артерии и вены и мелкие сосуды – капилляры, артериолы, венулы.

Артерии – сосуды, по которым кровь движется от сердца к органам. Стенка артерий состоит из трех оболочек: наружная – соединительно-тканная; средняя – мышечная и внутренняя – эндотелиальная. Самой крупной артерией является аорта. По мере отдаления от сердца калибр артерий уменьшается вплоть до мельчайших артериол, которые затем переходят в сеть капилляров.

**Функции артерий:**

- транспортирование и распределение крови по организму;

- поддерживание давления крови, чтобы обеспечить движение крови по капиллярам.

Капилляры – мельчайшие кровеносные сосуды. Стенка капилляров состоит из одного слоя эндотелиальных клеток, между которыми располагаются особые сократительные клетки. Из капилляров кровь переходит в венулы и вены.

**Функция капилляров** заключается в обмене между кровью и клетками тканей питательными веществами, газами, продуктами обмена.

**Вены** – сосуды, по которым течет кровь от органов к сердцу. Стенка вены состоит из тех же трех оболочек. Но в отличие от артерий мышечная стенка тоньше, а внутренняя оболочка большинства вен образует клапаны в виде кармашков, которые препятствуют обратному току крови.

Функция вен – возвращение крови от тканей к сердцу. Вены вмещают 70 - 80% всей циркулирующей крови.

**28. Артерии: классификация, строение, функция.**

**Строение.**

**Артерии эластического типа (arteria elastotypica).**

Внутренняя оболочка аорты состоит из 3 слоев: эндотелия, субэндотелия и сплетения эластических волокон.

Слой эндотелия - однослойный плоский эпителий ангиодермального типа. На люминальной поверхности эндотелиоцитов — микроворсинки, увеличивающие поверхность клеток. Длина эндотелиоцитов достигает 500 мкм, ширина — 140 мкм.

Функции эндотелия: 1) барьерная; 2) транспортная; 3) гемостатическая (вырабатывает вещества, препятствующие свертыванию крови и формирующие атромбогенную поверхность).

Субэндотелий составляет около 15 % от толщины стенки аорты, представлен рыхлой соединительной тканью, включающей тонкие коллагеновые и эластические волокна, фибробласты, звездчатые малодифференцированные клетки, отдельные продольно-ориентированные гладкие миоциты, основное межклеточное вещество, содержащее сульфатированные гликозаминогликаны; в пожилом возрасте появляются холестерин и жирные кислоты.

Сплетение эластических волокон (plexus fibroelasticus) представлено переплетением продольно и циркулярно расположенных эластических волокон.

Средняя оболочка аорты образована двумя тканевыми компонентами:

1) эластический каркас; 2) гладкая мышечная ткань.

Основу образуют 50-70 окончатые фенестрированные эластические мембраны (membrana elastica fenestrata) в виде цилиндров, у которых имеются отверстия, предназначенные для проведения питательных веществ и продуктов метаболизма.

Мембраны связаны между собой тонкими коллагеновым и эластическими волокнами – в результате формируется единый эластический каркас, который способен сильно растягиваться во время систолы. Между мембранами находится расположенные по спирали гладкие миоциты, выполняющие две функции: 1) сократительную (сокращение их уменьшает просвет аорты во время диастолы) и 2) секреторную (секретируют эластические и частично коллагеновые волокна). При замещении эластических волокон на коллагеновые способность возвращаться в исходное положение нарушается.

Наружная оболочка состоит из рыхлой соединительной ткани, в которой имеются большое количество коллагеновых волокон, фибробласты, макрофаги, тучные клетки, адипоциты, кровеносные сосуды (vasa vasorum) и нервы (nervi vasorum).

Функции аорты:

1) транспортная;

2) благодаря своей эластичности аорта расширяется во время систолы, затем спадается во время диастолы, проталкивая кровь в дистальном направлении.

Гемодинамические свойства аорты: систолическое давление около — 120 мм рт. ст., скорость движения крови — от 0,5 до 1,3 м/с.

**Артерии смешанного, или мышечно-эластического, типа (arteria mixtotypica).**

Данный тип представлен подключичной и сонной артериями. Эти артерии характеризуются тем, что их внутренняя оболочка состоит из 3 слоев: 1) эндотелия; 2) хорошо выраженного субэндотелия и 3) внутренней эластической мембраны, которой нет в артериях эластического типа.

Средняя оболочка состоит из 25 % окончатых эластических мембран, 25 % эластических волокон и примерно 50 % гладких миоцитов.

Наружная оболочка состоит из рыхлой соединительной ткани, в которой проходят сосуды сосудов и нервы. Во внутреннем слое наружной оболочки имеются пучки гладких миоцитов, расположенных продольно.

**Артерии мышечного типа (arteria myotypica).**

Этот тип артерий включает средние и мелкие артерии, расположенные в теле и внутренних органах.

Внутренняя оболочка этих артерий включает 3 слоя: 1) эндотелий; 2) субэндотелий (рыхлая соединительная ткань); 3) внутреннюю эластическую мембрану, которая очень четко выражена на фоне ткани стенки артерии.

Средняя оболочка представлена в основном пучками гладких миоцитов, расположенных спирально (циркулярно). Между миоцитами имеется рыхлая соединительная ткань, а также коллагеновые и эластические волокна. Эластические волокна вплетаются во внутреннюю эластическую мембрану и переходят в наружную оболочку, образуя эластический каркас артерии. Благодаря каркасу артерии не спадаются, что обусловливает их постоянное зияние и непрерывность тока крови.

Между средней и наружной оболочкой имеется наружная эластическая мембрана, которая выражена слабее, чем внутренняя эластическая мембрана.

Наружная оболочка представлена рыхлой соединительной тканью.

Влияние гемодинамических условий. Гемодинамические условия – это кровяное давление, скорость кровотока. В местах с сильным кровяным давлением преобладают артерии и вены эластического типа, т.к. они наиболее растяжимы. В местах, где нужна регуляция кровенаполнения (в органах, мышцах), преобладают артерии и вены мышечного типа.

**29. Вены: классификация, строение, функция.**

Вены – это сосуды, несущие кровь к сердцу

Вены:

Мышечного типа

-со слабым развитием мышечного слоя

-со средним развитием мышечного слоя

-с сильным развитием мышечного слоя

Безмышечного типа

**Развитие.**

Развивается из мезенхимы в стенке желточного мешка и ворсин хориона (вне тела зародыша) на 2-3 неделе эмбрионального развития. Мезенхимные клетки объединяются с образованием кровяных островков. Центральные клетки дифференцируются в первичные клетки крови (эритроциты 1 генерации), а периферические дают начало стенке сосуда. Через неделю после образования первых сосудов они появляются в теле зародыша в виде щелевидных полостей или трубочек. На 2 месяце происходит объединение зародышевых и незародышевых сосудов с образованием единой системы.

**Вена включает 3 оболочки:** внутреннюю, среднюю и наружную.

Степень развития миоцитов зависит от того, в какой части тела находятся вены: если в верхней части — миоциты развиты слабо, в нижней части или нижних конечностях — развиты хорошо. В стенке вен имеются клапаны (valvulae venosae), которые сформированы за счет внутренней оболочки. Однако вены мозговых оболочек, головного мозга, подвздошные, подчревные, полые, безымянные и вены внутренних органов клапанов не имеют.

**Вены безмышечного, или волокнистого типа** – это вены, по которым кровь течет сверху вниз под действием силы тяжести. Они расположены в мозговых оболочках, головном мозге, сетчатке глаза, плаценте, селезенке, костной ткани. Вены мозговых оболочек, головного мозга и сетчатки глаза расположены в краниальном конце тела, поэтому кровь оттекает к сердцу под влиянием собственной силы тяжести, а следовательно, нет необходимости в проталкивании крови при помощи сокращения мускулатуры.

**Вены мышечного типа** с сильным развитием миоцитов располагаются в нижней части тела и в нижних конечностях. Типичным представителем вен этого типа является бедренная вена. В ее внутренней оболочке имеется 3 слоя: эндотелий, субэндотелий и сплетение эластических волокон. За счет внутренней оболочки образуются выпячивания - клапаны. Основой клапана является соединительнотканная пластинка, покрытая эндотелием. Клапаны расположены таким образом, что при движении крови в сторону сердца их створки прижимаются к стенке, пропуская кровь дальше, а при движении крови в обратном направлении клапаны закрываются. Гладкие миоциты способствуют поддержанию тонуса клапанов.

Функции клапанов:

1) обеспечение движения крови в сторону сердца;

2) гашение колебательных движений в столбике крови, содержащейся в вене.

Субэндотелий внутренней оболочки развит хорошо, в нем содержатся многочисленные пучки гладких миоцитов, расположенные продольно.

Сплетение эластических волокон внутренней оболочки соответствует внутренней эластической мембране артерий.

Средняя оболочка бедренной вены представлена пучками гладких миоцитов, расположенных циркулярно. Между миоцитами имеются коллагеновые и эластические волокна (РВСТ), за счет которых формируется эластический каркас стенки вены. Толщина средней оболочки намного меньше, чем в артериях.

Наружная оболочка состоит из рыхлой соединительной ткани и многочисленных пучков гладких миоцитов, расположенных продольно. Хорошо развитая мускулатура бедренной вены способствует продвижению крови в сторону сердца.

Нижняя полая вена (vena cava inferior) отличается тем, что строение внутренней и средней оболочек соответствует строению таковых в венах со слабым или средним развитием миоцитов, а строение наружной оболочки — в венах с сильным развитием миоцитов. Поэтому эту вену можно отнести к венам с сильным развитием миоцитов. Наружная оболочка нижней полой вены в 6-7 раз толще внутренней и средней оболочек, вместе взятых.

При сокращении продольных пучков гладких миоцитов наружной оболочки образуются складки в стенке вены, которые способствуют продвижению крови в сторону сердца.

Сосуды сосудов в венах доходят до внутренних слоев средней оболочки. Склеротические изменения в венах практически не происходят, но из-за того, что кровь движется против силы тяжести и гладкая мышечная ткань развита слаб – возникает варикозное расширение вен.

**Влияние гемодинамических условий.**

Гемодинамические условия – это кровяное давление, скорость кровотока. В местах с сильным кровяным давлением преобладают артерии и вены эластического типа, т.к. они наиболее растяжимы. В местах, где нужна регуляция кровенаполнения (в органах, мышцах), преобладают артерии и вены мышечного типа.

**День 16 (08.06.2020 г)**

**41. Средний отдел пищеварительного тракта: особенности строения, функции. Желудок: функции, строение стенки (особенности строения слизистой оболочки желудка и желез желудка).**

**Функции желудка** : Секреторная – выделяет ферменты: пепсин, химозин, липазу и соляную кислоту. Механическая функция - пищевой комок смешивается и проталкивается в двенадцатиперстную кишку.

Вырабатывает антианемический фактор - способствует всасыванию витамина В12 поступивший с пищей.

Всасывательная функция - через стенку желудка всасывается вода, спирт, минеральные соли и сахар.

Экскреторная функция – при болезни почек некоторые остаточные азотистые продукты выделяются через стенку желудка.

Эндокринная функция - в желудке вырабатывается вещества гастрин, гистамин, серотонин, мотилин, энтероглюкагон биологические активные вещества.

**Строение**

Макроскопически желудок состоит из 4-х отделов: кардиального, фундального, тела и пилорического. Гистологически же выделяют только три отдела, т. к. дно и тело желудка сходны по строению и расцениваются как один отдел. Все отделы имеют некоторые особенности гистологического строения слизистой оболочки, в частности, желудочных желез.

Желудок — орган слоистого типа. Состоит из четырех оболочек: слизистой, подслизистой, мышечной и серозной. Слизистая оболочка имеет сложный рельеф, представленный желудочными ямками, складками и полями. Ямки — это углубления эпителия в собственную пластинку слизистой оболочки. Складки представляют собой выпячивания в просвет желудка слизистой и подслизистой оболочек. Поля — это участки слизистой оболочки, включающие группу желез, отграниченную от других таких же групп выраженной прослойкой рыхлой волокнистой соединительной ткани с просвечивающими кровеносными сосудами. Ямки и складки существенно увеличивают рабочую поверхность слизистой оболочки.

Слизистая оболочкасостоит из трех слоев: эпителиального, собственной и мышечной пластинок.

Эпителиальный слой представлен однослойным цилиндрическим железистым эпителием. Он образован железистыми эпителиоцитами — мукоцитами, секретирующими слизь. Слизь формирует непрерывный слой толщиной до 0,5 мкм, являясь важным фактором защиты слизистой желудка.

Собственная пластинка слизистой оболочки(6) образована рыхлой волокнистой соединительной тканью. В ней находятся мелкие кровеносные и лимфатические сосуды, нервные стволики, лимфоидные узелки. Основными структурами собственной пластинки являются железы. Все железы желудка простые трубчатые разветвленные. Они открываются в желудочные ямки и состоят из трех частей: дна, тела и шейки. В зависимости от локализации железы делятся на кардиальные, главные или фундальные и пилоричекие. Строение и клеточный состав этих желез неодинаковы. В количественном отношении преобладают главные железы. Они являются наиболее слаборазветвленными из всех желез желудка. Их **клеточный состав такой:**

Главные клетки; париетальные клетки; добавочные или слизистые клетки; эндокриноциты; шеечные мукоциты.

Мышечная пластинка слизистой оболочки состоит из трех слоев гладкой мышечной ткани: внутреннего и наружного циркулярных и среднего продольного. Функция обеспечение подвижности слизистой, участие в формировании ее рельефа.

Подслизистая оболочкаобразована рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью, содержит артериальное и венозное сплетения, ганглии подслизистого нервного сплетения Мейснера. В некоторых случаях здесь могут располагаться крупные лмфоидные фолликулы.

Мышечная оболочкаобразована тремя слоями гладкой мышечной ткани: внутренний косой, средний циркулярный, наружный продольный. В пилорическом отделе желудка циркулярный слой достигает максимального развития, формируя пилорический сфинктер.

Серозная оболочка образована двумя слоями: слоем рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани и лежащим на нем мезотелием. Железы желудка. 1) кардиальные — трубчатые, с сильно разветвленными концевыми отделами, часто имеющими широкий просвет. Располагаются в кардиальном отделе желудка, сходны с кардиальными железами пищевода. Содержат слизистые клетки (со светлой ЦП, уплощенным ядром, лежащим базально), которые вырабатывают мукоидный секрет, бикарбонаты и хлориды калия и натрия. Встречаются также отдельные главные, париетальные и эндокринные клетки (см. ниже). 2) собственные (фундальные) железы — неразветвленные, располагаются в теле и дне желудка и численно преобладают над другими типами желез. Группами по 3-7 впадают в небольшие желудочные ямки. В них выделяют суженную шейку, удлиненное тело и дно. Состоят из клеток 4х типов: главных, париетальных (обкладочных), шеечных, добавочных слизистых и эндокринных.

1) главные клетки — наиболее многочисленны в области тела и дна железы. Имеют пирамидную или цилиндрическую форму и крупное ядро, расположенное базально. ЦП — базофильная, зернистая, в базальной части клетки и вокруг ядра содержит много грЭПС, хорошо развитый КГ, в котором образуются крупные секреторные зимогенные гранулы (содержат пепсиноген и другие проферменты), накапливающиеся в апикальной части клетки и выделяющиеся в просвет железы. В просвете желудка пепсиноген под влиянием соляной кислоты превращается в активный пепсин.

2) париетальные (обкладочные) клетки — преобладают в области тела железы. Крупнее главных. Имеют округлую форму с узкой вершиной, обращенной в просвет железы, которой они вдаются между главными клетками, располагаясь кнаружи от них. Ядро лежит в центре клетки. В оксифильной ЦП много крупных МТХ с развитыми кристами и особые внутриклеточные секреторные канальцы в виде узких щелей, в которые обращены многочисленные микроворсинки. По периферии канальцев располагается тубуло-везикулярный комплекс — система мембранных пузырьков и трубочек (резерв мембраны, содержащей ионные насосы), которые сливаются с канальцами при активной секреции.

3) слизистые шеечные клетки — немногочисленны, располагаются в шейке. Небольших размеров. Цитоплазма — слабобазофильная, зернистая, содержит умеренно развитую грЭПС и крупный надъядерный КГ, от которого отделяются крупные слизистые гранулы, накапливающиеся у апикального полюса. Эти клетки часто делятся и рассматриваются как камбиальные элементы эпителия желез и покровного эпителия желудка, куда они, дифференцируясь, мигрируют. Обновление клеток в железах происходит гораздо медленнее, чем в покровном эпителии. Слизь, вырабатываемая шеечными клетками, возможно, предохраняет их от повреждения.

4) добавочные слизистые клетки — располагаются в теле собственных желез и имеют уплотненное ядро в базальной части клеток. В апикальной части этих клеток обнаружено множество круглых и овальных гранул, небольшое количество Мх и КГ.

5) эндокринные клетки — располагаются в дне желез. Светлые, форма — разнообразная (треугольная, овальная или полигональная). Апикальный полюс содержит ядро, не всегда достигает просвета железы. В базальном полюсе находятся плотные секреторные гранулы, выделяющиеся в кровь. Гранулы покрыты мембраной, окрашиваются солями серебра и хрома и содержат пептидные гормоны и амины. пилорические железы — трубчатые, с сильно разветвленными и извитыми концевыми отделами. Располагаются в пилорическом отделе. Впадают в очень глубокие желудочные ямки. Образованы слизистыми клетками, секрет которых защищает СО от кислого желудочного сока. Большинство желез не содержат париетальных клеток. В основном представлены эндокринными клетками.

**42.Тонкая кишка: функции, строение стенки. Система ворсинка-крипта, ее участие в пищеварении.**

Функции тонкой кишки:

1) Пищевые продукты расщепляется ферментативным путем и всасывается в кровь и лимфу. Ферменты – энтерокиназа, киназоген, эрепсин, трипсин расщепляют белки до аминокислот. Амилаза, мальтаза, сахараза, лактаза- расщепляют углеводы. Липаза – расщепляет жиры.

2)Механическая функция- пищевой комок проталкивается в каудальном направлением.

3) Эндокринная функция- выделяет серотонин, гистамин,мотилин, секретин, энтероглюкагон, холицистокинин, панкреозимин, гастрин.

Тонкая кишка разделяется на 3 отдела: 12 перстная, тощая и подвздошная. Стенка тонкой кишки образует складки, ворсинкии крипты. Складки имеют поперечное (циркулярное) направление, поэтому называется поперечные складки, и образованы слизистой и подслизистой оболочками. Ворсинки формируется за счет пальцевидных выростов слизистой оболочки, количество их в 1 мм2 12 перетной кишки достигает 22-40 ворсинок, в подвздошной 18-31 шт и длина их достигает 0,5-1,5 мм.

Поверхность ворсинки выстлана однослойным призматическим эпителием, и в нем различают: каемчатые цилиндрические, бокаловидные и эндокринные клетки. В каемчатых клетках различается апикальные и базальные части. На апикальной части расположены многочисленные микроворсинки, длина их достигает 0,9-1,2 мм. Диаметр 0,08-0,11мкм, увеличивает поверхность до 30-40 раз. Микроворсинки содержат гликокаликс, в нем находится ферменты. В цитоплазме клеток развиты эндоплазматическая сеть, лизосомы, митохондрий и комплекс Гольджи. Бокаловидные клетки это одиночно расположенные клетки, они выделяют слизистый секрет, при накопления секрета напоминает бокал, после выделения секрета имеют уплощенную форму. Под эпителием находится РВСТ, в ней встречается кровеносные сосуды, лимфоидные узелки и отдельные гладкомышечные клетки, за счет сокращение последных происходит всасывание питательных продуктов в кровь и лимфатические капилляры. Крипты- это углубления эпителия в слизистую оболочку, в результате образуется трубчатые структуры или железы. Количества крипт на 1мм2 достигает 100, общее количества их достигает 150 млн. В криптах кроме вышеперечисленных клеток также встречается малодифференцированные клетки и клетки с ацидофильной зернистостью (Панета). Малодифференцированные клетки крипт встречается в области дна крипт, в них встречается фигуры митотического деления. Кишечный эпителий восстанавливается через 2 суток. Апикальнозернистые клетки располагается в области дна крипт, на апикальной части этих клеток содержится ацидофильно окрашенные секреторные гранулы. В составе секрета содержится цинк, а клетка синтезирует фермент дипептидазу(эрепсин). В тонкой кишке из эндокринных клеток встречается А-клетки выделяют энтероглюкагон, S-секретин, 1-холицистокинин и панкреозимин, D, D1 , G – клетки встречаются чаще. Собственная пластинка содержит ретикулярные волокна, ретикулярные клетки, лимфоциты и плазматические клетки, а также лимфоидные фолликулы (0,5-3мм), у детей от 3-до 13 лет содержится более 15000 лимфоидных узелков. Мышечная пластинка состоит из 2 слоев- внутренний циркулярный, наружный– продольно направленных гладкомышечных клеток. Подслизистая оболочка состоит из РВСТ, в ней встречается кровеносные сосуды, нервные сплетения. В 12 перстной кишке в ее подслизистой оболочке находится сложные трубчатое(Бруннеровые) железы, они выделяют слизистой секрет, содержавший фермент дипептидазу. Мышечная оболочка состоит из 2 оболочек,внутреннийциркулярный, наружный – продольно направленных гладкомышечных элементов. Серозная оболочка состоит из брюшины.

**43. Толстая кишка: строение стенки, функции.**

Толстый кишечник состоит из 3 отделов:

· Слепая кишка с червеобразным отростком

· Ободочная кишка (восходящая, поперечная, нисходящая, сигмовидная)

· Прямая кишка

Стенка толстого кишечника образована 4 оболочками:

1. Слизистая оболочка – поверхность слизистой оболочки увеличена благодаря постоянным полулунным складкам. Ворсинки отсутствуют, кишечные крипты глубже, чем в тонком кишечнике. Состоит из 3 слоёв:

1.1. Эпителий – однослойный призматический, содержит клетки 4 типов:

1.1.1. Призматически клетки – располагаются на поверхности слизистой оболочки и в криптах. Высокие, узкие, сходны с каёмчатыми клетками тонкого кишечника, однако их щёточная каёмка развита значительно слабее. Образуются в глубине крипты. Обеспечивают процессы всасывания.

1.1.2. Бокаловидные клетки – находятся в криптах и на поверхности слизистой оболочки. Образуются в глубине крипт из недифференцированных клеток, заполняясь слизистыми гранулами. Их число увеличивается в направлении прямой кишки. Вырабатывают слизь, которая предотвращает повреждение слизистой оболочки и облегчает перемещение и удаление фекалий.

1.1.3. Недифференцированные клетки – лежат в глубине крипт, являются камбиальными элементами эпителия кишки. По мере миграции к устью крипты дифференцируются в бокаловидные или призматически клетки.

1.1.4. Эндокринные клетки – располагаются на дне крипт, относятся, преимущественно, к EC- (серотонин, мотилин, вещество P) и ECL- (гистамин) клеткам.

1.2. Собственная пластинка – состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Содержит капилляры и нервные волокна. Ретикулярные волокна имеют вид густой сети. В ней располагаются также одиночные лимфатические пузырьки.

1.3. Мышечная пластинка – состоит из 2 слоёв гладкомышечных клеток:

1.3.1. Наружный – продольный

1.3.2. Внутренний – циркулярный

2. Подслизистая основа – образована рыхлой волокнистой соединительной тканью с большим количеством эластических волокон, часто содержит жировую ткань. В ней располагаются лимфатические узелки, элементы подслизистых нервного (Мейснера), венозного и лимфатического сплетений.

3. Мышечная оболочка – образована 2 слоями гладкой мышечной ткани:

3.1. Наружный – продольный (имеет вид 3 лент, между которыми мышечная ткань развита слабо)

3.2. Внутренний – циркулярный

Между слоями мышечной оболочки располагаются прослойки соединительной ткани и элементы межмышечного нервного сплетения (Ауэрбаха).

4. Серозная оболочка – покрывает одни отделы толстой кишки полностью, другие – частично, где замещается адвентицией.

Червеобразный отросток (аппендикс) – пальцевидный вырост слепой кишки с узким звёздчатым или неправильной формы просветом, который содержит клеточный детрит и может облитерировться. Стенка его относительно толстая вследствие высокого содержания в ней лимфоидной ткани.

Особенности строения:

· Собственная пластинка содержит короткие крипты, а также многочисленные лимфатические узелки и межфолликулярные скопления лимфоидной ткани.

· Мышечная пластинка развита слабо

· Наружный (продольный) слой мышечной оболочки – сплошной

· Серозная оболочка полностью покрывает червеобразный отросток

Функции аппендикса:

· Червеобразный отросток выполняет защитную функцию и является периферическим органом иммунной системы. Он обеспечивает поглощение антигенного материала, его представление иммунокомпетентным клеткам с развитием иммунных реакций.

**44. Поджелудочная железа: общая характеристика, функции. Строение экзо- и эндокринной части железы.**

Поджелудочная железа включает 2 части: 1) экзокринную и 2) эндокринную.

В экзокринной части вырабатывается панкреатический сок, содержащий ферменты — трипсин, липазу, амилазу и др., который поступает в двенадцатиперстную кишку

В эндокринной части вырабатываются гормоны: инсулин, глюкагон, соматостатин, ВИП, панкреатический полипептид.

Развитие. Поджелудочная железа развивается на 3-4-й неделе эмбриогенеза из 2 зачатков: 1) эпителий — из дорсального и вентральных выпячиваний энтодермальной кишки, врастающих в брыжейку: 2) соединительнотканная строма, кровеносные сосуды и капсула — из мезенхимы. На 3-м месяце эмбриогенеза происходит дифференцировка зачатка на экзокринную и эндокринную части.

Общий план строения. Поджелудочная железа покрыта тонкой соединительнотканной капсулой, срастающейся с брюшиной. От капсулы отходят соединительнотканные тяжи, разделяющие железу на дольки. В тяжах находятся междольковые выводные протоки, кровеносные сосуды, нервы, интрамуральные нервные ганглии, пластинчатые тельца. Доля экзокринной части железы составляет 97 %, эндокринной — 3 %.

Экзокринная часть поджелудочной железы. Эта часть поджелудочной железы представлена панкреатическими ацинусами, межацинозными, внутридольковыми и междольковыми выводными протоками, впадающими в общий выводной проток, который открывается в двенадцатиперстную кишку.

Структурно-функциональной единицей экзокринной части является панкреатический ацинус. Он состоит из концевого отдела и вставочного протока. Ацинус имеет форму мешочка. Ацинусы отделяются друг от друга тонкими прослойками рыхлой соединительной ткани, богатой ретикулярными волокнами. В прослойках проходят капилляры, нервные волокна и находятся интрамуральные ганглии.

Железистые клетки ацинуса расположены на базальной мембране (ациноциты). В центре ацинусов располагаются клетки вставочных протоков.

Ациноциты имеют форму пирамид, широким концом лежат на базальной мембране, а узким апикальным концом обращены в просвет ацинуса. Цитолемма базального конца образует складки, на апикальной поверхности имеются микроворсинки

Функция ациноцитов заключается в синтезе белков пищеварительных ферментов (трипсина, липазы, амилазы и др.)

Вставочный проток ацинуса может внедряться в центр его концевого отдела в таком случае в центре ацинуса видны центроацинозные клеткц. На их поверхности имеются единичные микроворсинки.

Секрет ациноцитов поступает во вставочный проток, оттуда в межацинозный проток.

Межацинозные протоки выстланы кубическим эпителием. Межацинозные протоки впадают во внутридольковые протоки, выстланные кубическими эпителиоцитами. Внутридольковые протоки впадают в междольковые, лежащие в прослойке междольковой соединительной ткани и несущие секрет в общий проток поджелудочной железы.

Междольковые протоки и общий проток железы выстланы призматическим эпителием, среди клеток которого имеются бокаловидные эндокриноциты, и эндокриноциты, вырабатывающие панкреазимин и холецистокинин. Под эпителием находится собственная пластинка слизистой оболочки протоков.

Эндокринная часть поджелудочной железы. Эта часть поджелудочной железы состоит из панкреатических островков. В состав островков входят клетки, называемые инсулоцитами.

В зависимости от строения и содержания гранул различают 5 типов инсулоцитов: 1) В-клетки (базофильные); 2) А-клетки (ацидофильные); 3) D-клетки (дендритные); 4) D1-клетки (аргирофильные): 5) РР-клетки.

В-клетки расположены в центре островков. Функция В-клеток — выделение инсулина. Инсулин стимулирует усвоение клетками простых сахаров, которые под его влиянием синтезируются в гликоген и депонируются в цитоплазме клеток. При избытке инсулина в организме снижается уровень сахара в крови.

А-клетки располагаются преимущественно по периферии островков. В гранулах содержится глюкагон, под влиянием которого гликоген клеток расщепляется на простые сахара, поступающие в кровь. Это приводит к повышению сахара в крови (гипергликемия).

D-клетки имеют неправильную форму (грушевидную, звездчатую), располагаются по периферии островков. Гранулы D-клеток содержат соматостатин, под влиянием которого задерживается выделение инсулина В-клетками и глюкагона А-клетками, а также ингибируется синтез ферментов в ацинозных клетках поджелудочной железы.

Д1-клетки в гранулах имеется светлый ободок. В гранулах содержится ВИП, снижающий артериальное давление и стимулирующий секрецию ферментов и гормонов поджелудочной железой.

РР-клетки располагаются по периферии островков.Функция РР-клеток — секреция панкреатического полипептида. который стимулирует выделение желудочного и панкреатического соков.

Промежуточные клетки (ацинозно-инсулярные клетки) характеризуются содержанием в их цитоплазме зимогенных гранул, присущих ациноцитам, и гранул типа А, В и D. находящихся в инсулоцитах. Промежуточные клетки располагаются около островков между ацинусами. В зависимости от характера инсулярных гранул промежуточные клетки подразделяются на клетки 3 типов: А, В и D.

Инсулярные и зимогенные гранулы промежуточных клеток могут поступать в выводные протоки экзокринной части поджелудочной железы и в кровеносное русло. С током крови трипсиноподобные ферменты зимогенных гранул транспортируются к В-клеткам островков и способствуют освобождению инсулина из проинсулина.

**45. Печень: строение, функциональное значение.**

Печень (Hepar) самая большая железа пищеварительной системы. Масса ее у взрослого человека составляет около 1,5 - 2 кг. Расположена печень в правом подреберье, и меньшей частью в подчревной (эпигастральной) области и левом подреберье.

Сверху к печени прилежит диафрагма, под ней находится желудок, 12 п. кишка, ободочная кишка, правая почка и надпочечник.

**Границы печени:**

Верхняя - в 4 -ом межреберье по правой среднеключичной линии.

Нижняя - по реберной дуге на середину расстояния между мечевидным отростком и пупком.

Обе границы сходятся справа по средней подмышечной линии на уровне X - межреберья и слева по левой окологрудинной линии на уровне V-межреберья.

**Функции печени**

1. Защитная (барьерная) – очищает кровь от ядовитых веществ (индола, скатола), поступающих из толстого кишечника;

2. Пищеварительная - образование желчи;

3. Обменная – участие в обмене веществ: белков, жиров, углеводов.

4. Кроветворная - в эмбриональном периоде является органом кроветворения (эритропоэз).

5. Гомеостатическая – участвует в поддержании гомеостаза и в функциях крови.

6. Депонирующая – содержит в виде запаса в своих сосудах до 0,6 л крови.

7. Гормональная – участвует в образовании биологически активных веществ (простагландины, кейлоны).

8. Синтетическая – синтезирует и депонирует некоторые соединения (белки плазмы, мочевина, креатин).

**Внешнее строение печени**

Печень имеет:

1) две поверхности:

- верхнюю – диафрагмальную

- нижнюю висцеральную.

2) два края:

- передний острый внизу;

- тупой задний.

Передний край печени отделяет одну поверхность от другой.

По диафрагмальной поверхности печени проходит серповидная связка, которая делит ее на две доли - правую и левую.

На висцеральной поверхности проходит три борозды: две продольные (правая и левая) и одна поперечная. Они разделяют печень снизу на 4 доли:

1. правую

2. левую

3. квадратную

4. хвостатую

В правой продольной борозде впереди расположен желчный пузырь, а сзади нижняя полая вена. В левой продольной борозде – круглая связка печени.

В поперечной борозде находятся ворота печени, через которые входят:

1. воротная вена

2. печеночная артерия и нервы;

Выходят:

1. общий печеночный проток;

2. лимфатические сосуды.

Печень покрыта брюшиной почти со всех сторон, за исключением заднего края, которым она сращена с диафрагмой и участка на висцеральной поверхности, к которым прилежит желчный пузырь и нижняя полая вена.

Внутреннее строение печени.

Печень является перенхиматозным органом, состоящим из долей. Доли состоят из долек, которые являются структурно-функциональными единицами печени (т.е. наименьшей частью органа, способной выполнять его функции). Всего в печени человека имеется около 500 тысяч долек.

Печеночная долька построена из печеночных клеток (гепатоцитов), расположенных в виде радиальных балок - печеночных пластинок вокруг центральной вены. Каждая балка состоит из двух рядов гепотоцитов, между которыми имеется желчный ход, куда стекает желчь, выделяемая печеночными клетками.

Желчные ходы сливаются в более крупные, а затем правый и левый печеночные протоки, которые в области ворот печени сливаются в общий печеночный проток.

В отличие от других органов в печень притекает артериальная кровь по печеночной артерии и венозная кровь по воротной вене из непарных органов брюшной полости - желудка, поджелудочной железы, селезенки, тонкого и большей части толстого кишечника.

Внутри органа печеночная артерия и воротная вена постепенно разветвляются на более мелкие артерии и вены (долевые, сегментарные и междольковые), от которых берут начало внутридольковые кровеносные капилляры, впадающие в центральную вену дольки. Центральные вены всех долек, сливаясь между собой, образуют 2-3 печеночные вены, которые выходят из печени и впадают в нижнюю полую вену.

Воспаление печени называется гепатитом.

**46. Дыхательная система: общая характеристика. Воздухоносные пути. Строение трахей и бронхов различных калибров.**

**Трахея** – полый трубчатый орган, состоящий из слизистой оболочки, подслизистой основы, волокнисто – хрящевой и адвентициальной оболочек.

Слизистая оболочка при помощи тонкой подслизистой основы связана с фиброзно – хрящевой оболочкой трахеи благодаря этому не образует складок. Она выстлана многорядным призматическим реснитчатым эпителием, в котором различают реснитчатые, бокаловидные, ондокринные и базальные клетки.

Реснитчатые клетки призматической формы, имеют на свободной поверхности около 250 ресничек. Мерцание ресничек обеспечивает выведение слизи с осевшими на ней пылевыми частицами вдыхаемого воздуха и микробами.

Бокаловидные клетки – одноклеточные эндоэпителиальные железы – выделяют слизистый секрет, богатый гиалуроновой и сиаловой кислотами, на поверхность эпителиального пласта. Их секрет вместе с слизистым секретом желез подслизистой основы увлажняет эпителий и создает условия для прилипания попадающих с воздухом пылевых частиц. Нейроэндокринные клетки имеют пирамидальную форму,округлое ядро и секреторные гранулы. Эти клетки выделяют пептидные гормоны и биогенные амины и регулируют сокращения мышечных клеток воздухоносных путей. Базальные клетки – камбиальные, имеют овальную или треугольную форму.

Под базальной мембраной эпителия располагается собственная пластинка слизистой оболочки, состоящая из рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, богатая эластическими волокнами продольного направления.

Подслизистая основа трахеи состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани. В ней располагаются смешанные белково – слизистые железы.

Волокнисто – хрящевая оболочка трахеи состоит из 16 – 20 гиалиновых хрящевых колец, не замнкнутых на задней стенке трахеи за счет чего она мягкая что имеет большое значение при глотании. Свободные концы этих хрящей соединены пучками гладких мышечных клеток, прикрепляющихся к наружной поверхности хряща.

Адвентициальная оболочка трахеи состоит из рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, которая соединяет этот орган с прилежащими частями средостения.

Строение стенки бронхов крупного и среднего калибров. Стенка бронхов этих калибров включает 4 оболочки: 1) слизистую; 2) подслизистую основу: 3) фиброзно-хрящевую: 4) адвентициальную.

Слизистая оболочка состоит из 3 слоев: 1) эпителиального; 2) собственной пластинки; 3) мышечной пластинки.

Слой эпителия представлен многорядным эпителием включающим реснитчатые, бокаловыдние, базальные и эндокринные клетки. По мере уменьшения бронхов эпителий уменьшается.

Собственная пластинка слизистой оболочки представлена рыхлой соединительной тканью, богатой продольно расположенными эластическими волокнами. В ней содержатся одиночные лимфатические узелки.

Мышечная пластинка слизистой оболочки состоит из циркулярно расположенных миоцитов.

Подслизистая основа представлена рыхлой соединительной тканью в которой находятся концевые отделы белково – слизистых бронхиальных желез.

Фиброзно- хрящевая оболочка состоит из волокнистой соединительной и хрящевой тканей.

Адвентициальная оболочка представлена рыхлой соединительной тканью, волокна которой заходят в интерстициальную ткань легких.

Строение стенки бронхов малого калибра. Стенка бронхов этого калибра вклучает 2 оболочки: 1( слизистую и 2) адвентициальную.

Слизистая оболочка состоит из слоев: 1) эпителиальной пластинки; 2) собственной пластинки; 3) мышечной пластинки.

Эпителиальная пластинка представлена двурядным или однорядным реснитчатым эпителием, среди клеток которого отсутствуют бокаловидные экзокриноциты. Собственная пластинка стоит из рыхлой соединительной ткани, богатой эластическими волокнами. Мышечная пластинка представлена относительно толстым слоем циркулярно расположенных миоцитов. Функциональное значение мышечной пластинки слизистой оболочки малых бронхов заключается в том что она участвует в регуляции проведения воздуха при вдохе и выдохе.

Терминальные бронхиолы. Стенка терминальных бронхиол состоит из 2 истонченных оболочек: 1) слизистой и 2) адвентициальной.

Слизистая оболочка состоит из 3 слоев: 1) эпителиальной пластинки. 2) собственной пластинки и 3) мышечной пластинки.

Эпителиальная пластинка представлена кубическим реснитчатым эпителием, среди клеток которого имеются секреторные клетки Клара, каемчатые и безресиитчатые клетки.

Секреторные клетки Клара узким основанием лежат на базальной мембране.

Функция секреторных клеток — выделяют липопротеины и гликопротеины и ферменты, участвующие в дезинтоксикации поступающих в дыхательные пути токсинов.

Каемчатые (щеточные) клетки имеют форму бочонка, т. е. узкое основание, узкую апикальную часть и широкую среднюю часть.

Функция каемчатых клеток — воспринимают запахи (обонятельная функция).

Безреснитчатые эпителиоциты имеют призматическую форму, несколько возвышаются над остальными эпителиоцитами. Их функция неизвестна.

**47. Легкие: общая морфо-функциональная характеристика. Респираторный отдел легкого (ацинус). Морфология всех компонентов ацинуса. Строение стенки альвеол. Аэрогема гический (воздушно-кровяной) барьер.**

**Легкое.** Это бронхиальное дерево и респираторный отдел.

Бронхиальное дерево относится к воздухоносным путям легких. Оно начинается главными бронхами крупного калибра (диаметр — около 15 мм), отходящими от трахеи (бифуркация трахеи). От главных бронхов отходят по 2 внелегочных долевых бронха 1-го порядка крупного калибра (диаметр — около 12 мм). От этих бронхов отходят 4 внелегочных зональных бронха 2-го порядка крупного калибра (диаметр 10-6 мм). От бронхов 2-го порядка отходят 10 внутрилегочных сегментарных бронха 3-го порядка среднего калибра (диаметр — около 5 мм). От них отходят субсегментарные бронхи 4-го порядка среднего калибра (диаметр 4-3 мм), которые переходят в субсегментарные бронхи 5-го порядка среднего калибра (диаметр 3 мм). От бронхов 5-го порядка отходят бронхи малого калибра, или малые бронхи (диаметр 2-1 мм). Малые бронхи разветвляются на терминальные (конечные) бронхиолы, диаметр которых составляет 1-0,5 мм. Этими бронхиолами заканчивается бронхиальное дерево.

Строение стенки бронхов крупного и среднего калибров. Стенка бронхов этих калибров включает 4 оболочки: 1) слизистую; 2) подслизистую основу: 3) фиброзно-хрящевую: 4) адвентициальную.

Слизистая оболочка состоит из3 слоев: 1) эпителиального; 2) собственной пластинки; 3) мышечной пластинки.

Слой эпителия представлен многорядным эпителием включающим реснитчатые, бокаловыдние, базальные и эндокринные клетки. По мере уменьшения бронхов эпителий уменьшается.

Собственная пластинка слизистой оболочки представлена рыхлой соединительной тканью, богатой продольно расположенными эластическими волокнами. В ней содержатся одиночные лимфатические узелки.

Мышечная пластинка слизистой оболочки состоит из циркулярно расположенных миоцитов.

Подслизистая основа представлена рыхлой соединительной тканью в которой находятся концевые отделы белково – слизистых бронхиальных желез.

Фиброзно- хрящевая оболочка состоит из волокнистой соединительной и хрящевой тканей.

Адвентициальная оболочка представлена рыхлой соединительной тканью, волокна которой заходят в интерстициальную ткань легких.

Строение стенки бронхов малого калибра. Стенка бронхов этого калибра вклучает 2 оболочки: 1( слизистую и 2) адвентициальную.

Слизистая оболочка состоит из слоев: 1) эпителиальной пластинки; 2) собственной пластинки; 3) мышечной пластинки.

Эпителиальная пластинка представлена двурядным или однорядным реснитчатым эпителием, среди клеток которого отсутствуют бокаловидные экзокриноциты. Собственная пластинка стоит из рыхлой соединительной ткани, богатой эластическими волокнами. Мышечная пластинка представлена относительно толстым слоем циркулярно расположенных миоцитов. Функциональное значение мышечной пластинки слизистой оболочки малых бронхов заключается в том что она участвует в регуляции проведения воздуха при вдохе и выдохе.

Терминальные бронхиолы. Стенка терминальных бронхиол состоит из 2 истонченных оболочек: 1) слизистой и 2) адвентициальной.

Слизистая оболочка состоит из 3 слоев: 1) эпителиальной пластинки. 2) собственной пластинки и 3) мышечной пластинки.

Эпителиальная пластинка представлена кубическим реснитчатым эпителием, среди клеток которого имеются секреторные клетки Клара, каемчатые и безресиитчатые клетки.

Секреторные клетки Клара узким основанием лежат на базальной мембране.

Функция секреторных клеток — выделяют липопротеины и гликопротеины и ферменты, участвующие в дезинтоксикации поступающих в дыхательные пути токсинов.

Каемчатые (щеточные) клетки имеют форму бочонка, т. е. узкое основание, узкую апикальную часть и широкую среднюю часть.

Функция каемчатых клеток — воспринимают запахи (обонятельная функция).

Безреснитчатые эпителиоциты имеют призматическую форму, несколько возвышаются над остальными эпителиоцитами. Их функция неизвестна.

Респираторный отдел легких. Легочный ацинус — это структурно-функциональная единица легких. С ацинуса начинается респираторная часть легкого. Он представляет собой разветвление респираторной бронхиолы 1-го порядка. Как же разветвляется эта бронхиола? Респираторная бронхиола 1 -го порядка делится на 2 респираторные бронхиолы 2-го порядка, каждая из которых разветвляется на 2 бронхиолы 3-го порядка, от которых отходят по 2 альвеолярных хода, каждый альвеолярный ход заканчивается 2 альвеолярными мешочками. В стенках респираторных бронхиол, альвеолярных ходов и альвеолярных мешочков имеются альвеолы.

Таким образом, разветвления респираторной бронхиолы 1-го порядка и все альвеолы, входящие в их состав, — это и есть легочный ацинус.

Ацинусы отделяются друг от друга прослойками рыхлой соединительной ткани. 12-18 ацинусов образуют дольку легкого, которая также отделена от других долек прослойкой рыхлой соединительной ткани.

Стенка респираторных бронхиол истончена и включает 2 слабо выраженные оболочки: 1) слизистую и 2) адвентициальную.

Слизистая оболочка респираторных бронхиол выстлана однослойным кубическим безреснитчатым эпителием, в котором иногда встречаются реснитчатые эпителиоциты, имеются секреторные клетки Клара.

Собственная пластинка слизистой оболочки истончена, мышечная пластинка представлена отдельными циркулярно расположенными пучками гладких миоцитов.

Адвентициальная оболочка респираторных бронхиол, представленная рыхлой соединительной тканью, также истончена, ее волокна переходят в межальвеолярную соединительную ткань.

В стенке респираторных бронхиол имеются отдельные альвеолы. Стенка альвеолярных ходов и альвеолярных мешочков состоит из альвеол.

Альвеолы представляют собой незамкнутые пузырьки диаметром 120-140 мкм, открывающиеся в просвет респираторных бронхиол, альвеолярных ходов и альвеолярных мешочков. Между альвеолами имеются соединительнотканные перегородки. В перегородках проходят капилляры. Альвеолы сообщаются между собой при помощи альвеолярных пор Куна.

Стенка альвеол выстлана альвеолоцитами (пневмоцитами), лежащими на базальной мембране, укрепленной каркасом, состоящим из тонких коллагеновых и ретикулярных волокон. Альвеолоциты альвеол представлены 2 основными типами: респираторными (альвеолоциты I типа) и секреторными (альвеолоциты II типа). В стенке альвеол и на их поверхности имеются альвеолярные макрофаги.

Респираторные альвеолоциты имеют уплощенную форму, в их цитоплазме присутствуют мелкие митохондрии и пиноцитозные пузырьки, на апикальной поверхности есть короткие выросты (микроворсинки). Напротив безъядерной части альвеолоцитов лежит безъядерная часть эндотелиоцитов. Поэтому перегородка между воздухом альвеол и просветом капилляров, образующая аэрогематический барьер, составляет около 0,5 мкм. В состав аэрогематического барьера входят: безъядерная часть респираторных альвеолоцитов, базальная мембрана альвеол, межальвеолярная соединительная ткань, базальная мембрана капилляра и эндотелий.

Функция респираторных альвеолоцитов — газообмен между воздухом альвеол и гемоглобином эритроцитов (дыхательная функция).

Секреторные альвеолоциты, или альвеолоциты II типа, или большие альвеолоциты выстилающих внутреннюю поверхность стенки альвеолы. Они имеют кубическую или овальную форму, от их цитолеммы отходят микроворсинки.

Функция секреторных альвеолоцитов — секретируют компоненты сурфактантного альвеолярного комплекса, т. е. фосфолипиды и белки.

Сурфактантный альвеолярный комплекс покрывает внутреннюю поверхность альвеолоцитов и включает 3 компонента: 1) мембранный, сходный по строению с клеточными мембранами и включающий фосфолипиды и белки, синтезируемые секреторными альвеолоцитами: 2) гипофазу (жидкий компонент), состоящий из липопротеинов и гликопротеинов, выделяемых секреторными клетками Клара; 3) резервный сурфактант.

Функциональное значение сурфактантного альвеолярного комплекса: 1) препятствует слипанию внутренней поверхности стенок альвеол во время выдоха (если бы альвеолы слиплись, то следующий вдох был бы невозможен и через 4-5 минут наступила бы смерть); 2) препятствует проникновению микроорганизмов из альвеол в окружающую их соединительную (интерстициальную) ткань; 3) препятствует поступлению (транссудации) жидкости из интерстициальной ткани в альвеолы.

Альвеолярные макрофаги имеют отростчатую форму, овальное ядро и хорошо развитый лизосомальный аппарат, располагаются в стенке альвеол или на их наружной поверхности, могут мигрировать из альвеол в интерстициальную ткань. В их цитоплазме содержатся включения липидов, при окислении которых вдыхаемый воздух согревается, его температура должна соответствовать температуре тела.

Функция макрофагов — защитная, они фагоцитируют микроорганизмы, частицы пыли, фрагменты клеток и сурфактант; участвуют в обмене липидов, выделяют тепловую энергию.

**Респираторный отдел легких.** Легочный ацинус — это структурно-функциональная единица легких. С ацинуса начинается респираторная часть легкого. Он представляет собой разветвление респираторной бронхиолы 1-го порядка. Как же разветвляется эта бронхиола? Респираторная бронхиола 1 -го порядка делится на 2 респираторные бронхиолы 2-го порядка, каждая из которых разветвляется на 2 бронхиолы 3-го порядка, от которых отходят по 2 альвеолярных хода, каждый альвеолярный ход заканчивается 2 альвеолярными мешочками. В стенках респираторных бронхиол, альвеолярных ходов и альвеолярных мешочков имеются альвеолы.

Таким образом, разветвления респираторной бронхиолы 1-го порядка и все альвеолы, входящие в их состав, — это и есть легочный ацинус.

Ацинусы отделяются друг от друга прослойками рыхлой соединительной ткани. 12-18 ацинусов образуют дольку легкого, которая также отделена от других долек прослойкой рыхлой соединительной ткани.

Стенка респираторных бронхиол истончена и включает 2 слабо выраженные оболочки: 1) слизистую и 2) адвентициальную.

Слизистая оболочка респираторных бронхиол выстлана однослойным кубическим безреснитчатым эпителием, в котором иногда встречаются реснитчатые эпителиоциты, имеются секреторные клетки Клара.

Собственная пластинка слизистой оболочки истончена, мышечная пластинка представлена отдельными циркулярно расположенными пучками гладких миоцитов.

Адвентициальная оболочка респираторных бронхиол, представленная рыхлой соединительной тканью, также истончена, ее волокна переходят в межальвеолярную соединительную ткань.

В стенке респираторных бронхиол имеются отдельные альвеолы. Стенка альвеолярных ходов и альвеолярных мешочков состоит из альвеол.

Альвеолы представляют собой незамкнутые пузырьки диаметром 120-140 мкм, открывающиеся в просвет респираторных бронхиол, альвеолярных ходов и альвеолярных мешочков. Между альвеолами имеются соединительнотканные перегородки. В перегородках проходят капилляры. Альвеолы сообщаются между собой при помощи альвеолярных пор Куна.

**48. Почки: строение, функция. Корковые и мозговые нефроны. Гистоструктура различных отделов нефрона. Процесс мочеобразования, первичная и вторичная моча.**

Почки располагаются в забрюшинном пространстве поясничной области. Снаружи почка покрыта соединительнотканной капсулой. Почка состоит из коркового и мозгового вещества. Граница между этими частями неровная, так как структурные компоненты коркового вещества вдаются в мозговое в виде колонок, а мозговое вещество проникает в корковое, образуя мозговые лучи.

Основной структурно-функциональной единицей почки является нефрон. Нефрон представляет собой эпителиальную трубочку, которая начинается слепо в виде капсулы почечного тельца, далее переходящей в канальцы разного калибра, впадающей в собирательную трубочку. В каждой почке имеется около 1-2 млн нефронов. Длина канальцев нефрона составляет 2-5 см, а общая длина всех канальцев в обеих почках достигает 100 км.

В нефроне различают капсулу клубочка почечного тельца, проксимальный, тонкий и дистальный отделы.

Почечное тельце состоит из клубочковой капиллярной сети и эпителиальной капсулы. В капсуле различают наружную и внутреннюю стенки (листки). Последняя вместе с эндотелиоцитами клубочковой капиллярной сети формирует гематонефридиальный гистион. Клубочек капиллярной сети расположен между приносящей и выносящей артериолами. Приносящая артериола чаще дает четыре разветвления, которые распадаются на 50-100 капилляров. Между ними имеются многочисленные анастомозы. Эндотелий капилляров клубочковой сети состоит из плоских эндотелиоцитов с многочисленными фенестрами в цитоплазме размером около 0,1 мкм. Фенестрированные (окончатые) эндотелиоциты представляют собой своеобразное сито. Снаружи от эндотелиоцитов располагается общая для эндотелия и эпителия внутренней стенки капсулы базальная мембрана, толщиной около 300 нм. Для нее характерно трехслойное строение.

Эпителий внутренней стенки капсулы охватывает со всех сторон капилляры клубочковой сети. Состоит он из одного слоя клеток, называемых подоцитами. Подоциты имеют слегка вытянутую неправильную форму. Тело подоцита имеет 2-3 крупных длинных отростка, называемых цитотрабекулами. От них в свою очередь отходит много мелких отростков — цитоподий.

Цитоподии представляют собой узкие цилиндрические образования (ножки) с утолщениями на конце, посредством которых они прикрепляются к базальной мембране. Между ними имеются щелевидные пространства размером 30-50 нм. Эти щели имеют определенное значение в процессах фильтрации при образовании первичной мочи. Между петлями капилляров клубочковой сети находится разновидность соединительной ткани (мезангии), содержащая волокнистые структуры и мезангиоциты.

Эпителий наружной стенки капсулы клубочка состоит из одного слоя плоских эпителиоцитов. Между наружной и внутренней стенками капсулы имеется полость, в которую поступает первичная моча, образующаяся в результате клубочковой фильтрации.

Процесс фильтрации является первым этапом мочеобразования. Фильтруются практически все компоненты плазмы крови, за исключением высокомолекулярных белков и форменных элементов крови. Жидкость из просвета капилляра проходит через фенестрированные эндотелиоциты, базальг ную мембрану и между цитоподиями подоцитов с их многочисленными фильтрационными щелями, прикрытыми диафрагмами, в полость капсулы клубочка. Гематонефридиаль-ный гистион проницаем для глюкозы, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, хлоридов и низкомолекулярных белков. Эти вещества входят в состав ультрафильтрата — первичной мочи. Большое значение для эффективной фильтрации имеет разность диаметров приносящей и выносящей клубочковых артериол, что создает высокое фильтрационное давление (70-80 мм рт. ст.), а также большое количество капилляров (около 50-60) в составе клубочка. Во взрослом организме в течение суток образуется около 150-170 л первичного фильтрата (мочи).

Столь эффективная фильтрация плазмы, осуществляемая почками практически беспрерывно, способствует максимальному удалению из организма вредных продуктов метаболизма — шлаков. Следующим этапом мочеобразования является обратное всасывание (реабсорбция) необходимых организму соединений (белков, глюкозы, электролитов, воды) из первичного фильтрата с образованием окончательной мочи. Процесс реабсорбции происходит в канальцах нефрона.

В проксимальном отделе нефрона различают извитую и прямую части канальца. Это самый протяженный участок канальцев (около 14 мм). Диаметр проксимального извитого канальца составляет 50-60 мкм. Здесь происходит облигатная реабсорбция органических соединений по типу рецепторно-опосредованного эндоцитоза с участием энергии митохондрий. Стенка проксимального канальца состоит из однослойного кубического микроворсинчатого эпителия. На апикальной поверхности эпителиоцитов находятся многочисленные микроворсинки длиной 1-3 мкм (щеточная каемка). Число микроворсинок на поверхности одной клетки достигает 6500, что увеличивает активную всасывающую поверхность каждой клетки в 40 раз. В плазмолемме эпителиоцитов между микроворсинками имеются углубления с адсорбированными макромолекулами белков, из которых формируются транспортные пузырьки.

Общая поверхность микроворсинок во всех нефронах составляет 40-50 м2. Второй характерной особенностью строения клеток эпителия проксимального канальца является базальная исчерченность эпителиоцитов, образованная глубокими складками плазмолеммы и закономерным расположением между ними многочисленных митохондрий (базальный лабиринт). Плазмолемма эпителиоцитов базального лабиринта обладает свойством транспорта натрия из первичной мочи в межклеточное пространство.

**49. Моче выводящие пути: функция, строение стенки мочеточника.**

К мочевыводящим путям относят почечные чашечки, лоханки, мочеточники, мочевой пузырь и мочеиспускательный канал. Строение этих органов в общих чертах сходно, так как их стенка состоит из слизистой оболочки, подслизистой основы, мышечной и наружной оболочек. Эпителий мочевыводящих путей называется переходным. Он относится к эпителиям кожного типа. В эпителии различают базальные клетки, выполняющие роль камбия, и более дифференцированные поверхностные клетки. При этом около половины поверхностных клеток являются полиплоидными.

В стенке почечных чашечек описаны особые гладкие мышечные клетки — водители ритма (пейсмекеры). За счет ритмического сокращения этих клеток моча порциями поступает из собирательных трубочек и происходит опорожнение почечных чашечек.

В мочеточниках гладкая мышечная ткань образует в верхней половине два слоя: внутренний — продольный и наружный — циркулярный. В нижней части мочеточников добавляется еще один продольный слой, расположенный снаружи от циркулярного.

В мочевом пузыре слизистая оболочка приспособлена к растяжению, связанному с периодическим накоплением мочи. Эпителий при этом меняет свою гистологическую картину от растянутого двухслойного до псевдомногослойного в спавшемся пузыре. В слизистой оболочке мочевого пузыря сильно развиты сосудистые подэпителиальные сплетения. Мышечная оболочка мочевого пузыря состоит из трех слоев: внутреннего, наружного с продольным расположением гладких миоцитов и среднего — циркулярного. В шейке мочевого пузыря имеется мышечный сфинктер.

Наружная оболочка образована соединительной тканью, а в области дна — серозной оболочкой. Мочевой пузырь иннервируется симпатическими и парасимпатическими, а также спинальными нервами. В нем имеется много вегетативных нервных ганглиев.

Стенка мужского мочеиспускательного канала состоит из слизистой и мышечной оболочек, а женского — слизистой, мышечной и адвентициальной оболочек. Эпителий слизистой оболочки из переходного постепенно трансформируется в многослойный плоский неороговевающий. В составе эпителия встречаются скопления слизистых клеток. Собственная пластинка слизистой оболочки содержит уретральные слизистые железы. Мышечная оболочка включает внутренний продольный и наружный циркулярный слои гладких миоцитов.

При прохождении мочеполовой диафрагмы мужская уретра окружается поперечнополосатой мышечной тканью наружного сфинктера мочевого пузыря. Женская уретра в средней своей части окружается поперечнополосатой мышечной тканью наружного сфинктера.

Возрастные изменения мочевыводящих путей. В постнатальном периоде продолжаются рост и развитие нефронов. При этом увеличиваются их длина и толщина. В связи с этим на единицу массы почечной ткани у взрослого приходится в 10 раз меньше почечных телец по сравнению с новорожденным.

Реактивность и регенерация мочевыводящих путей. Реактивные изменения почек при действии экстремальных факторов (переохлаждение организма, отравление ядовитыми веществами, действие проникающей радиации, ожоги, травмы и др.) весьма разнообразны с преимущественным поражением сосудистых клубочков или эпителия различных отделов нефрона вплоть до гибели нефронов.

Регенерация нефрона происходит более полно при внутриканальцевой гибели эпителия. Наблюдаются клеточная и внутриклеточная формы регенерации. Эпителий мочевыводящих путей обладает достаточно выраженной восстановительной способностью.

Аномалии мочевыделительной системы, органогенез которой достаточно сложен, являются одним из наиболее частых пороков развития. Причинами их образования могут быть как наследственные факторы, так и действие различных повреждающих факторов — ионизирующего излучения, алкоголизма и наркомании родителей и др. Вследствие того, что нефроны и собирательные трубочки имеют разные источники развития, неправильность или отсутствие их контактов друг с другом приводит к патологии развития почек (поликистоз, гидронефроз, агенезия почек и др.).

**50. Морфо-функциональная характеристика мужской половой системы Семенники. Строение, гистофизиология. Фазы сперматогенеза. Эндокринная функция семенника. Особенности строения семявыносящих путей. Предстательная железа.**

Развитие. Развитие мужской половой системы склады­вается из 2 фаз: 1) индифферентной, так как в течение этой фазы и мужская и женская половые системы развиваются одинаково, и 2) дифференцированной, во время которой обе системы развиваются по-разному.

На 3-й неделе эмбриогенеза в стенке желточного мешка образуются первичные половые клетки — гонобласты, или гаметобласты. Гонобласты с током крови мигрируют к пер­вичным почкам. На 4-й неделе эмбриогенеза на поверхности первичных почек образуется половой валик, состоящий из целомического эпителия. Клетки полового валика выделяют химическое вещество, вызывающее положительный хемо­таксис гонобластов. Поэтому в этот валик и внедряются гоно­бласты, которые здесь размножаются и дифференцируются в гоноциты. Затем от половых валиков в сторону первичной почки врастают половые шнуры, состоящие из клеток цело­мического эпителия и гоноцитов. Одновременно с этим от мезонефрального протока отщепляется парамезонефральный проток. На этом к началу 6-й недели эмбриогенеза за­канчивается индифферентная фаза.

Дифференцированная фаза. В половых Y-хромосомах сперматозоидов имеется ген половой детерминации, кото­рый обеспечивает развитие эмбриона по мужскому типу. На 6 неделе эмбриогенеза в зачатке семенника образуется 1 ингибин, под действием которого происходит редукция парамезонефрального протока. От него остается только верхняя часть которая позже дифференцируется в простатическую маточку. На 9 неделе эмбриогенеза в мезенхиме между половыми шнурами развиваются интерстициальные клетки, вырабатывающие тестостерон.

Строение. Снаружи большая часть семенника покрыта серозной оболочкой – брюшиной, под которой располагается плотная соединительнотканная оболочка, получившая название белочной. На заднем крае яичка белочная оболочка утолщается, формируя средостение, от которого в глубь железы отходят соединительнотканные перегородки, разделяющие железу на дольки, в каждой из которых находится 1-4 извитых семенных канальца. Приближаясь к средостению, канальцы сливаются и становятся прямыми, а в толще средостения соединяются с канальцами сети семенника. Из этой сети выходит 10 – 12 выносящих канальцев, впадающих в проток придатка.

Стенку семенного канальца образует собственная оболочка, состоящая из базального слоя, миоидного слоя и волокнистого слоя. Внутреннюю выстилку канальца образует эпителиосперматогенный слой, расположенный на базальной мембране.

Базальный слой состоит из сети коллагеновых волокон. Миоидный слой образован миоидными клетками, содержащими актиновые филаменты. Они обеспечивают ритмические сокращения стенки канальцев. Наружный волокнистый слой состоит из 2 частей – неклеточного слоя, образованного базальной мембраной миоидных клеток и коллагеновыми клетками, за ними слоя, состоящего из фибробластоподобных клеток

В соединительной ткани между семенными канальцами расположены гемокапилляры и лимфокапилляры, обеспечивающие обмен веществ между кровью и сперматогенным эпителием.

Эпителиосперматогенный слой имеет 2 основных популяции клеток: сперматогенные клетки и поддерживающие клетки. Между соседними поддерживающими клетками формируются зоны плотных контактов, которые подразделяют сперматогенный эпителий на два отдела – наружный базальный и внутренний адлюминальный.

Генеративная функция (сперматогенез) складывается из 4 стадий: размножение, рост, созревание, формирование.

Размножение. В процессе 1 стадии происходит митотическое деление сперматогоний. Их 2 типа – стволовые клетки типа А – темные, резервные, неделящиеся; полустволовые клетки типа А – светлые, быстро делящиеся. Из делящихся светлых А клеток образуются дифференцирующиеся клетки А и В. Они появляются в виде цепочек синцития. Затем эти цепочки проходят через приоткрывающуюся зону плотных контактов в адлюминальную часть и вступают во 2 стадию. (сперматоциты 1 порядка)

Рост. Этя стадия состоит из 5 фаз: лептотены, синаптены, пахитены, диплотены, диакинеза.

Лептотена – хромосомы сперматоцитов подвергаются сперализации и становятся видимыми подобно тонким нитям.

Синаптена – гомологичные хромосомы объединяются попарно образуя биваленты, в которых происходит кроссинговер.

Пахитена – хромосомы бивалентов подвергаются дальнейшей спирализации , утолщению и укорочению.

Диплотена – хромосомы бивалентов и хроматиды хромосом начинают расходиться.

Диакинез – спирализацияхромосом бивалентов и образование тетрад.1 бивалент 1 тетрада состоящая из 4 хроматид. Всего образуется 23 тетрады.

Стадия созревания. Стадия созревания включает 2 деления (1 -е деление созревания и 2-е деление созревания).

1-е деление созревания начинается с метафазы. В сперматоците 1 -го порядка тетрады выстраиваются в плоскости экватора таким образом, что одна половинка (диада) тетрады обращена к одному полюсу клетки, а другая — к другому. После этого начинается анафаза, во время которой диады расходятся к полюсам клетки. Затем наступает телофаза, в результате которой образуются 2 новые клетки, называемые сперматоцитами 2-го порядка. В каждом сперматоците 2-го порядка содержится по 23 диады (диплоидный набор хромосом).

2-е деление созревания тоже начинается с метафазы, при которой в сперматоците 2-го порядка диады выстраиваются в плоскости экватора таким образом, что одна половинка диады (монада, или хроматида) обращена к одному полюсу клетки, другая — к другому. Во время анафазы хроматиды расходятся к полюсам сперматоцита 2-го порядка. В результате телофазы из каждого сперматоцита 2-го порядка образуется по 2 сперматиды, в каждой из которых содержится гаплоидный набор хромосом.

Стадия формирования. Во время стадии формирования, или спермиогенеза, сперматиды погружаются в углубления сустентоцитов. На том полюсе ядра сперматиды, который обращен к сустентоциту, располагается комплекс Гольджи. На противоположном полюсе располагается клеточный центр, состоящий из 2 центриолей.

Комплекс Гольджи преобразуется в плотную гранулу, которая, разрастаясь, покрывает переднюю половину ядра. Эта шапочка называется акробластом и характерна для ранних сперматид. В центре акробласта поздней сперматиды формируется плотное тельце, которое называется акросомой. В акросоме содержатся фиртилизационные ферменты (ферменты. участвующие в оплодотворении). Среди этих ферментов есть 2 основных фермента: гиалуронидаза и трипсин. Одна из центриолей клеточного центра, расположенного на противоположном полюсе, прилежит к ядру и называется проксимальной. Вторая центриоль называется дистальной. Дистальная центриоль делится на 2 кольца: проксимальное и дистальное. От проксимального кольца начинается жгутик. Дистальное кольцо при этом смещается и образует границу между промежуточным и главным отделом жгутика. Главный отдел хвоста (жгутика) заканчивается терминальным отделом.

Во время стадии формирования значительная часть цитоплазмы сбрасывается и остается только в виде тонкого слоя, покрывающего головку, где расположено ядро, и хвост.

Митохондрии смещаются в область промежуточной части хвоста, расположенной между двумя кольцами дистальной центриоли.

Следовательно, фаза формирования — это трансформация сперматиды в сперматозоид.

Таким образом, сформированный сперматозоид состоит из головки, включающей ядро, акробласт и акросому, и хвоста. Хвост включает 4 отдела: 1) связующий отдел (шейка), расположенный между проксимальной центриолью и проксимальным кольцом дистальной центриоли; 2) промежуточный отдел, расположенный между проксимальным и дистальным кольцами центриоли: 3) главный отдел, начинающийся от дистального кольца дистальной центриоли, который заканчивается 4) терминальным отделом.

В центральной части жгутика проходит осевая нить, состоящая из 9 пар периферических и 1 пары центральных микротрубочек.

**Эндокринные функции**

В рыхлой соединительной ткани между петлями извитых канальцев располагаются интерстициальные клетки — гландулоциты (клетки Лейдига), скапливающиеся здесь вокруг кровеносных капилляров. Эти клетки сравнительно крупные, округлой или многоугольной формы, с ацидофильной цитоплазмой, вакуолизированной по периферии, содержащей гликопротеидные включения, а также глыбки гликогена и белковые кристаллоиды в виде палочек или лент. С возрастом в цитоплазме интерстициальных клеток начинает откладываться пигмент. Хорошо развитая гладкая эндоплазматическая сеть, многочисленные митохондрии с трубчатыми и везикулезными кристами указывают на способность интерстициальных клеток к выработке стероидных веществ, в данном случае мужского полового гормона

**Семяеыносящие пути**

Семявыносящие пути составляют систему канальцев яичника и его придатков, по которым сперма (сперматозоиды и жидкость) продвигается в мочеиспускательный канал.

Отводящие пути начинаются прямыми канальцами яичка , впадающими в сеть яичка, располагающуюся в средостении . От этой сети отходят 12—15 извитых выносящих канальцев , которые соединяются с протоком придатка в области головки придатка . Этот проток, многократно извиваясь, формирует тело придатка и в нижней хвостовой части его переходит в прямой семявыносящий проток, поднимающийся к выходу из мошонки, а затем достигающий предстательной железы, где впадает в мочеиспускательный канал.

Все семявыводящие пути построены по общему плану и состоят из слизистой, мышечной и адвентициальной оболочек. Эпителий, выстилающий эти канальцы, обнаруживает признаки железистой деятельности, особенно выраженной в головке придатка.

В прямых канальцах яичка эпителий образован клетками призматической формы. В канальцах сети семенника в эпителии преобладают кубические и плоские клетки. В эпителии семявыводящих канальцев чередуются группы реснитчатых клеток с железистыми клетками, секретирующими по апокриновому типу.

В придатке яичка эпителий протока становится двухрядным. В его составе находятся высокие призматические клетки, несущие на своих апикальных верхушках стереоцилии, а между базальными частями этих клеток располагаются вставочные клетки. Эпителий протока придатка принимает участие в выработке жидкости, разбавляющей сперму во время прохождения сперматозоидов, а также в образовании гликокаликса — тонкого слоя, которым покрываются сперматозоиды. Удаление гликокаликса при эякуляции приводит к активизации сперматозоидов. Одновременно придаток семенника оказывается резервуаром для накапливающейся спермы.

Продвижение спермы по семявыводящим путям обеспечивается сокращением мышечной оболочки, образованной циркулярным слоем гладких мышечных клеток.

Проток придатка далее переходит в семявыносящий проток, в котором значительно развивается мышечная оболочка, состоящая из трех слоев — внутреннего продольного, среднего циркулярного и наружного продольного. В толще мышечной оболочки располагается нервное сплетение, образованное скоплением ганглиозных клеток, иннервирующих пучки гладких мышечных клеток. Сокращениями их обеспечивается эякуляция спермы. В связи со значительным развитием мышечной оболочки слизистая оболочка семявыносящего протока собирается в продольные складки. Дистальный конец этого протока ампулообразно расширен. Снаружи семяотводящие пути на всем протяжении покрыты соединительнотканной адвентициальной оболочкой.

Ниже места соединения семявыносящего протока и семенных пузырьков начинается семявыбрасывающий проток. Он проникает через предстательную железу и открывается в мочеиспускательный канал. В отличие от семявыносящего протока семявыбрасывающий проток не имеет столь выраженной мышечной оболочки. Наружная оболочка его срастается с соединительнотканной стромой простаты.

**Предстательная железа** – мышечно-железистый орган, охватывающий верхнюю часть мочеиспускательного канала, в которую открываются протоки многочисленных простатических желез.

Развивается из эпителия уретры начинается на 11-12 неделе эмбриогенеза.

Строение. Предстательная железа – дольчатая железа, покрытая тонкой соединительнотканной капсулой. Ее паренхима состоит из многочисленных отдельных слизистых желез. Железы располагаются вокруг мочеиспускательного канала тремя группами: центральная, периферическая и переходная.

Центральная группа состоит из мелких желез в составе слизистой оболочки непосредственно вокруг мочеиспускательного канала. Промежуточная группа в виде кольца залегает в соединительной ткани подслизистой основы.

Периферическая группа состоит из собственно предстательных желез.концевые отдела альвеолярно-трубчатых желез образованы высокими слизистыми экзокриноцитами, между ними располагаются мелкие вставочные клетки. Выводные протоки выстланы многорядным призматическим эпителием. Мышечно-эластическую строму железы образует рыхлая волокнистая соединительная ткань и мощные пучки гладких мышечных клеток, радиально расходящиеся от центра железы и разделяющие ее на дольки. Каждая долька и железа окружены продольными и циркулярными слоями гладких мышечных клеток, которые сокращаясь выбрасывают секрет из желез в момент эякуляции.

В месте впадения семявыносящего канала в мочеиспускательный канал в предстальной железе расположен семенной бугорок, возбуждение которого вызывает его эрекцию благодаря чему предотвращается попадание эякулята в мочевой пузырь. Позади семенного бугорка располагается предстательная маточка.

Секрет железы участвует в разжижении эякулята. Влияет на половую дифференцировку гипоталамуса, а также вырабатывает фактор, стимулирующий рост нервных волокон.

**День 17 (09.06.2020 г)**

**1. Организация рабочего места лаборанта-гистолога.**

**Рабочий стол**

 При отсутствии специального стола может быть приспособлен любой стол (желательно с ящиками) с площадью рабочей поверхности не менее 60 \*120 см.

Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из какого - либо влагоустойчивого материала. Однако участок стола, предназначенный для непосредственной работы по приготовлению препаратов, в любом случае необходимо накрыть стеклом и расположить под ним небольшие (9\*12 см) листы белой или черной бумаги. Этим создаете» соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными (белый лист) и не окрашенными (черный лист) объектами. Рекомендуется также на оба листа нанести контуры предметного стекла с обозначением места расположения и размеров покровного стекла. Этот простой прием позволяем рационально разместить на предметном стекле срезы в процессе их заключения.

Для того чтобы удобнее расположить необходимое оборудование, следует иметь двухъярусную полку, для реактивов,, растворов и посуды, которая устанавливается либо перед работающим (вдоль заднего края стола), либо сбоку в зависимости от расположения стола относительно источника света.

**Необходимая лабораторная посуда**

 - широкогорлые банки с притертыми пробками различной вместимости от 50 до 200 мл - используют для составления гистологических батарей, предназначенных для подготовки кусочков тканей к заливке различными средами. Более крупные банки применяют для фиксации и хранения кусочков тканей в фиксирующих жидкостях, обработки предметных стекол, 6приготовления нейтрального формалина и пр. Вместо банок с притертыми пробками можно использовать небольшие хозяйственные банки с жестяными завинчивающимися крышками разного объема.

 - бюксы - небольшие круглые стеклянные стаканчики различного диаметра и высоты со шлифованными крышками.

 - биологические стаканчики - круглые, овальные или четырехугольные (как и высокие бюксы) применяют для проводки гистологических срезов, монтированных на предметных стеклах. Для придания устойчивости и обеспечения порядка в расстановке их помещают в специальные стойки, изготовленные из дерева или пластмассы, по нескольку жук в ряд зависимости от методики обработки.

 - чашки Петри - широкие, плоские стеклянные чашки с крышками-пригодны для различных манипуляций (окраска свободно плавающих и наклеенных на предметные стекла срезов, использование в качестве подставок под бюксы и т.д.).

 - мерная посуда - цилиндры и мензурки различной емкости (от 10 до 250-500 мл) воронки различных размеров.

 - химические стаканчики - круглые стеклянные стаканчики без крышек вместимостью 50-100 мл - находят широкое применение при проведении химических реакций, окраски срезов наклеенных на стекла и т.д.

 - колбы (плоскодонные) вместимостью от 50 до 2 л. Малые колбы применяют для приготовления и хранения растворов различных красителей, большие - под дистиллированную воду и прочие жидкости, расходуемые в больших количествах.

 - пипетки обычные (предназначенные для закапывания лекарств) используют для накалывания на срезы красителей и различных жидкостей, градуированные (вместимостью 0,1-100 мл) применяют для отмеривания малых количеств различных жидкостей. Можно использовать в настоящее время широко используемые автоматические пипетки различной вместительности.

 - предметные стекла - прямоугольные пластины размером 76\*25мм толщиной 1 мм. предназначенные для размещения гистологических срезов, расположенных на предметных стеклах. Размеры предметных стекол выбирают в зависимости от площади объекта.

**Инструменты**

 Инструменты, используемые в гистологической лаборатории, включает пинцеты, скальпели, кровоостанавливающие зажимы, корцанги, шпатели, препаровальные иглы - прямые и изогнутые, металлические и стеклянные. Стеклянные иглы необходимы при импрегнации серебром, когда металлическими иглами пользоваться нельзя, также необходимо иметь спиртовку, волосяную кисточку для снятия срезов с микротомного ножа, фильтровальную бумагу, иголки» нитки, плотную бумагу для этикетирования материала, лейкопластырь и карандаш по стеклу.

**2. Требования, предъявляемые к гистологическому препарату. Основные этапы приготовления гистопрепарата. Взятие материала, этикетировка.**

**Качественно приготовленный гистологический препарат должен:**

* иметь толщину не более 10 мкм,
* быть хорошо расправленными без образования складок и разрывов;

· при невозможности получить качественный срез допускается изготовление срезов и их фрагментов различной толщины;

* окраска срезов должна быть равномерной с четким дифференцированием различных структур;
* срезы должны быть хорошо просветлены;
* не допустимо загрязнение срезов инородными частицами, кристаллами красителя, а также попадание пузырьков воздуха под покровное стекло;
* из одного объекта изготавливают 1 - 2 среза для одной методики окраски;
* при необходимости число срезов может быть большим, вплоть до серии последовательных срезов;
* после изготовления препаратов на предметном стекле тушью или восковым карандашом обозначают номер экспертного исследования и год изготовления гистологических препаратов.

**Правила взятия гистологического материала**

 При микроскопическом исследовании тканей и органов большое значение имеет техника взятия материала. Соблюдение приведенных правил взятия материала позволит уменьшить количество артефактов и ошибок при гистологическом исследовании.

1. Кусочки органов следует вырезать острым ножом или бритвой.

Пользоваться ножницами во избежание размятия тканей не рекомендуется. Нельзя сдавливать кусочки, скоблить или протирать их поверхность, особенно слизистую и серозную оболочки.

2. Кусочки вырезают толщиной 0,5-1 см, длина и ширина может быть различной (обычно 1- 1,5 см) с таким расчетом, чтобы получаемый срез поместился под стандартное покровное стекло. Ввиду медленного проникновения фиксатора в глубину ткани взятие на исследование более толстых кусочков не рекомендуется.

3. Кусочки сразу же помещают в фиксирующую жидкость. Недопустимо обмывание кусочков водой перед фиксацией.

**Маркировка**

• Четкая, хорошо читаемая печать;

• Стойкость маркировки к множественным смывкам и длительному воздействию агрессивных растворителей (ксилол, толуол, спирт, гексан, ацетон и др.);

• Надежное сцепление этикетки с поверхностью из пластика и стекла;

• Поверхность этикетки не должна окрашиваться при обработке образца красящим веществом;

• Долговечность - маркировка должна сохранять читаемость в течение нескольких лет.

**3. Фиксация. Цель и правила фиксации. Промывка материала.**

Взятый для гистологического исследования материал сразу же должен подвергаться фиксации. Фиксация — метод обработки ткани с целью закрепления ее прижизненной структуры. Это достигается путем воздействия на ткань специальных растворов (фиксаторов). Наиболее существенным изменением, происходящим в тканях под воздействием фиксатора - является процесс свертывания (коагуляции) белков. Количество фиксатора следует брать в 20-100 раз больше объема кусочка фиксируемого материала. Существуют фиксаторы простые и сложные. К простым относятся 10-20% раствор формалина, 96° спирт, 100 (абсолютный) спирт, 1-2% раствор осмиевой кислоты и др. Сложные фиксаторы: спирт - формол (спирт 70° — 100 мл. и формалин 2-5 мл.) жидкость Ценкера (сулема — 5 г, сернокислый натрий — 1 г., двухромовокислый калий - 2,5 г, дистиллированная вода 100 мл., ледяная уксусная кислота 5 мл.) и др. Продолжительность фиксации —от нескольких часов до 1 суток и более в зависимости от свойств фиксатора и характера исследуемого материала.

**Правила работы с фиксаторами**

Практически все фиксаторы относятся к токсичным веществам (альдегиды, ацетоны» спирты), некоторые ядовиты (сулема, тетраоксид осмия, метанол), поэтому необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с реактивами, которые используют в гистологической практике.

Фиксацию и вырезку материала необходимо производить в вытяжном шкафу. Материал, извлеченный из фиксатора, содержащего формалин, желательно в течение нескольких минут промыть в проточной воде, так как пары формалина оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и органов дыхания.

**Промывка в воде**

После фиксации материал промывают (чаще всею в течение нескольких часов в проточной воде) с тем, чтобы избавить его от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей.

Изучить с помощью микроскопа такие фиксированные кусочки органов невозможно, т.к. они не прозрачны. Чтобы кусочек органа можно было микроскопировать, его надо разрезать на очень тонкие пластинки - срезы, толщина которых измеряется в микрометрах. Такие срезы получают с помощью специальных приборов - микротомов. Но для того, чтобы резать на микротоме кусочек ткани, ее надо предварительно уплотнить. Это достигается путем пропитывания застывающими жидкостями - расплавленным парафином. Парафин в воде не растворяется, и поэтому промытый после фиксации кусочек ткани необходимо предварительно обезводить, и только затем пропитывать.

**4. Фиксаторы: простые и сложные фиксирующие жидкости.**

**Характеристика фиксаторов**

**Простые фиксаторы**

**Химическая фиксация:**

- альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид)

- хромовая кислота

- тетраоксид осмия

- спирты (этанол, метанол)

- ацетон

- соли ртути (сулема)

-кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, азотная)

**Альдегиды** - Можно хранить месяцами, надо всего лишь контролировать рН.

**Формалин** - представляющий собой 40% раствор формальдегида. Формальдегид - это газ, растворимый в воде до концентрации 40% по массе. В гистологической практике используют 10% раствор формалина, что соответствует 4% формальдегиду.

Продолжительность фиксации 24—48 ч при 20°С.

Фиксатор может содержать примеси, в основном метанола (до 16%). Методы приготовления свободного от метанола формальдегид:.

**4% формальдегид по Гайеру:**

- 2гр. параформальдегида

- 50мл 0,1М фосфатного буфера (рН 7,4-7,6) = нагревают до 70 °С до просветления раствора, помешивают, охлаждают и фильтруют. Его рН 7,3-7,5.

**40% формальдегид по Глауерт:**

Готовят 40% параформальдегид (40гр порошка формальдегида + 100мл дистиллированной воды при нагревании до 65С, перемешивая. + несколько капель 40%гидроксида натрия до просветления раствора.

**Фиксатор Лилли для кислых гликозаминогликанов.**

-Нитрат свинца 8гр;

- 40% раствор формальдегида 10мл;

- Вода 10мл;

- Этанол 80мл

Продолжительность фиксации 24 часа при комнатной температуре ( при 4С- 2-3дня, 10-14 дней при-25С).

**Фиксатор Жандра для гликогена.**

1. Пикриновая кислота, насыщенная в 96% спирте 85 частей

2. Раствор формальдегида 40% 10 частей

3. Ледяная уксусная кислота 5 частей

**Тетраоксид осмия.**

Не коагулируются, а желатинизируются, ткани не сморщиваются. Одновременно является контрастирующим веществом в электронной микроскопии. Дорогой реагент, поступает в продажу в ампулах по 0,5 - 2 гр. Разбивают в бумаге и помещают в воду больше 24ч для 1-4 % раствора. Хранят я темноте при комнатной температуре месяцами. Для первичной фиксации липидов используют 1% раствор на 0,1 М фосфатном буфере.

Для 1 фиксации: 2% ТО в ДВ -5мл; натрия хлорид -850мг; 0,2М фосфатный буфер- 5мл. Для вторичной используют сахарозу вместо натрия.

**Этиловый спирт (80 %, 90 %, 96 % и 100 %).**

Его применяют для осаждения белков, в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку. Продолжительность фиксации от 2 часов до 1 суток. Увеличение длительности фиксации, особенно в 100 % спирте, нежелательно, так как материал значительно уплотняется и происходит его пересушивание. Оптимальная температура для фиксации материала в спирте +4°С, но ее можно проводить и при комнатной температуре. Если после спиртовой фиксации предстоит резать ткань на замораживающем микротоме или криостате, то кусочки промывают в течение 1 —2 ч до их полного погружения на дно банки, при этом происходит насыщение ткани водой.

**Уранилацетат.**

Используют в электронной микроскопии как третий фиксатор (после альдегида и тетраоксида осмия) и одновременно как контрастер. Хорошо выявляет мембраны благодаря стабилизации фосфолипидов, стабилизации ДНК. Применяют 0.25-2% в воде или в 50-70% спирте (окрашивание 8 минут).

Ацетон используют для увеличения скорости фиксации. Применяют 100% ацетон, для получения которого в коммерческий ацетон засыпают прокаленный сульфат меди (медный купорос) или силикагель. В ацетоне фиксируют кусочки толщиной 3 - 4 мм в течение 2 часов при 20 гр. С или 30 мин— 1 часа в термостате при 60 °С в плотно закрытой посуде. Ацетон значительно уплотняет ткань и при увеличении продолжительности фиксации возможно сморщивание объектов. Чаще ацетон применяют для обработки материала срочных биопсий при его заливке в парафин.

**Кислоты.**

Азотная, пикриновая, уксусная, трихлоруксусная. Быстро проникают, препятствуют сморщиванию, ослабляют состояние гидратации. Входят в состав декальцинирующих смесей.

**Фиксатор Жандра для гликогена.**

- Пикриновая кислота, насыщенная в 96% спирте- 85 частей; раствор формальдегида 40% -10 частей; ледяная уксусная кислота -5 частей.

**Жидкость Буэна.**

Классический фиксатор для экспериментальных исследований: насыщенный раствор пикриновой кислоты - 75 мл; нейтральный 40 % формалин -25 мл; ледяная уксусная кислота -5 мл.

Продолжительность фиксации 1—24 часов при 20 °С. Насыщенный раствор пикриновой кислоты готовят заранее из расчета 3 г. кристаллической пикриновой кислоты на 1 л. горячей дистиллированной воды. После фиксации кусочки отмывают от избытка пикриновой кислоты в 70 % спирте, затем заливают в парафин.

**Сулема (дихлорид ртути).**

Сулему применяют в качестве фиксатора с начала развития гистологии. Готовят насыщенный раствор: 10 г сулемы на 100 мл дистиллированной воды или изотонического раствора хлорида натрия доводят до кипения, охлаждают, фильтруют. Продолжительность фиксации кусочков толщиной 3 мм 6—12 часов при 20 °С. При фиксации сулемой возможно появление в тканях кристаллического осадка, который удаляют путем обработки срезов йодированным 70 % спиртом (на 50 мл 70 % спирта — 5—10 капель 5 % спиртового раствора йода до появления оранжевого цвета). По мере обесцве-чивания йодированного спирта со срезами его заменяют свежей порцией вплоть до полной потери цвета, затем срезы промывают в 3—4 сменах 70 % спирта.

**Сложные фиксаторы**

Составными частями сложных фиксаторов являются простые. Существует множество вариантов фиксирующих смесей. Ниже приведены наиболее распространенные.

**Спирт - формол по Шаферу.**

- 10 % нейтральный формалин, который готовят из 1 части нейтрального

40 % формалина и

- 2-3 частей- 96 % спирта.

Продолжительность фиксации 24-48 ч. Дальнейшая промывка в воде не требуется, и материал сразу же помещают в 96 % спирт.

**Кальций - формол по Бейкеру** используют для фиксации липидов.

10 мл 40% формалина + 90 мл дистиллированной воды; 1 г хлорида кальций; растворы смешивают.

- Продолжительность фиксации 24—48 ч при 20°С.

- Для гистохимических исследований с успехом применяют фиксатор Бейкера, приготовленный из параформальдегида.

- К 50 г параформальдегида и 500 мл дистиллированной воды добавляют с одновременным встряхиванием несколько капель 1 н. гидроксида натрия до исчезновения осадка.

- 10 г хлорида кальция + 500 мл дистиллированной воды.

- Растворы А и Б смешивают, добавляют 0,5 г активированного угля. Перед использованием фильтруют.

Продолжительность фиксации 24—48 часов при 20°С.

**Используется также фиксатор Карнуа**, в состав которого входят: 75 мл- 100 % спирта; 25 мл ледяной уксусной кислоты.

Условия фиксации те же. В случае отсутствия этилового спирта вместо жидкости Карнуа можно использовать смесь следующего состава: изопропиловый спирт -60мл; пропионовая кислота - 30мл; ацетон 10мл; диоксан - 10мл.

Продолжительность фиксации 12-24 ч при 20 °С; для промывки и обезвоживания применяют изопропиловый спирт.

**Жидкость Ценкера — сулемовая смесь.**

- Бихромат калия -2,5г; сульфат натрия- 1 г; дистиллированная вода 100мл (это-жидкость Мюллера); сулема 5г; ледяная уксусная кислота 5мл.

Ледяную уксусную кислоту можно заменить нейтральным 10 % формалином (фиксатор Максимова, ценкер - формол). Продолжительность фиксации 1—24 часов при 20°С. После фиксации материал в течение 12—24 часов отмывают в проточной воде и помещают в йодированный 70% спирт для удаления остатков сулемы. При добавлении 10 мл 2 % раствора тетраоксида осмия хорошо фиксируются и окрашиваются липиды. В последнее время для гистологических исследований часто применяют глутаровый альдегид, параформальдегид, особенно в тех случаях, когда материал предназначается одновременно для нескольких видов исследования (иммуноморфологического, электронно - микроскопического), а его количество ограничено, например, при пункционных биопсиях.

**5. Уплотнение материала: а) обезвоживание; б) заливка в плотные застывающие среды - парафин, целлоидин.**

**Уплотнение материала**

С помощью микроскопа можно изучать только прозрачные срезы, следовательно, они должны быть тонкими (толщиной в сотые или тысячные доли миллиметра). Существуют специальные аппараты — микротомы, по-зволяющие разрезать материал на пластинки требуемой толщины, но для этого необходимо предварительно кусочек уплотнить. Это делают путем замораживания и резки на замораживающем микротоме или пропитыванием застывающими жидкостями (например, подогретым парафином) и последующей резки на обычном микротоме. После фиксации кусочки промывают, обезвоживают, заливают в парафин и затем режут.

**Промывка позволяет очистить материал от фиксатора**. После фиксации в формалине, хромовых и сулемовых жидкостях материал промывают в проточной воде в течение 1—2 суток. После фиксации в смеси с пикриновой кислотой для промывки используют 70% спирт.

От качества обезвоживания зависит качество заливки.

**Обезвоживание проводят в "батарее"** со спиртами, крепость которых постепенно повышается. Обезвоживание ткани производятся постепенно (чтобы не произошло сморщивания) путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50°, 60\*, 70°, 80°, 90°, 96°, 100°: В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка. Спирты разной концентрации готовят по прилагаемой таблице.

|  |  |
| --- | --- |
| **Для получения 100 мл** | **Объем составных частей** |
| Спирт 96° | H2O | Спирт 90° | H2O | Спирт 80° | H2O | Спирт 70° | H2O |
| 40°45°50°60°70°80°90° | 42475263738394 | 5853483727176 | 445056677889- | 565044332211- | 5056637588-- | 5044372512-- | 57647186--- | 43362914--- |

На практике можно пользоваться упрощенным расчетом: брать количество спирта в миллилитрах, равное крепости требуемого рабочего спирта, и к нему доливать столько воды, чтобы их сумма соответствовала цифре крепости исходного спирта. Например, исходный спирт 96%. Для получения 60% спирта следует к 60 мл исходного спирта долить 36 мл воды. Исходным материалом для получения абсолютного (100%) спирта служит 96% этиловый спирт. Отнятие воды проводят с помощью извести (СаСОз) или обезвоженного медного купороса. Медный купорос (меди сульфат) удерживает 5 молекул кристаллизованной воды. Химически чистый медный купорос прокаливают в стеклянной или фарфоровой посуде, помешивая стеклянной палочкой до получения белого порошка безводной соли. Для обезвоживания 100 мл спирта, налитого в банку с притертой пробкой, туда помещают 10 г обезвоженного медного купороса. В течение 1 — 2 дней банку часто встряхивают. Купорос приобретает голубой цвет. Тогда спирт сливают в новую банку, куда насыпают белый порошок купороса, и продолжают его встряхивать. Если купорос слегка посинеет, то спирт сливают в третью банку с белым купоросом. Если после встряхивания купорос перестанет синеть, абсолютный спирт аккуратно сливают или фильтруют в чистую сухую бутылку и закрывают резиновой пробкой. С помощью свежепрокаленной извести спирт можно обезводить быстрее. Для этого его кипятят с негашеной известью 1—2 ч на водяной бане.

**Обезвоживание проводят** в чисто вымытых и высушенных банках или бутылках с притертыми пробками. Для получения качественных препаратов его необходимо проводить постепенно. Нельзя сразу после промывки водой помещать кусочки в 96% спирт. Если же фиксацию или промывку проводили спиртом, то обезвоживание начинают со спирта более высокой концентрации. Материал последовательно переносят в спирт более крепкий. Время нахождения материала в спиртах зависит от размеров кусочков и характера ткани (1—2 ч для маленьких объектов, 1—2 суток для кусочков толщиной 2 см). Обычно его выдерживают в каждом спирту не менее 24 ч. При переносе кусочков в более крепкий спирт их просушивают фильтровальной бумагой. Спирты быстро загрязняются веществами, которые извлекаются из материала, особенно жиром. Их нужно проверять, смешивая с водой. Если при этом появляется белая густая муть — спирты подлежат замене.

**Дегидратация, просветление и заключение срезов после окраски.**

После завершения окраски необходимо получить препарат, пригодный для микроскопического исследования. С этой целью используют застывающие прозрачные среды, которые помещают на окрашенный срез и накрывают чистым покровным стеклом длинной 22 мм. Приготовленный таким образом препарат после микроскопирования может длительно сохраняться в архиве. Если заключающая среда растворима в воде, то на окрашенные препараты наносят такую среду сразу после промывки и осторожно (чтобы избежать появления пузырьков воздуха) накрывают покровным стеклом. Когда заключающая среда застывает, препарат можно исследовать под микроскопом. Примером простой водорастворимой заключающей среды является глицерин-желатина. Ее и другие водорастворимые среды используют чаще при работе с криостатными и замороженными и вибратомными срезами, а также при окраске красителями, экстрагирующимися в этаноле. Для заключения парафиновых срезов чаще всего используют природные смолы (канадский или пихтовый бальзамы, даммарлак) и синтетические среды (биомаунт, полистирол, капрат целлюлозы, DPX, пермаунт), которые нерастворимы в воде, но растворяются в ксилоле. Наиболее распространенными заключающими средами являются канадский бальзам и полистирол. Перед заключением в такие среды срезы необходимо обезводить в спиртах восходящей крепости (например в 80%, 96%, 100% этанолах, абсолютном этаноле-ксилоле 1:1 по 1-3 мин) и просветлить в двух порциях орто - ксилола (1-3 мин). Ксилолы и спирты рекомендуется менять после проводки каждых 40-50 препаратов. Канадский бальзам можно приобретать готовым к применению или в сухом виде. В последнем случае его растворяют в орто - ксилоле до получения густой сиропообразной жидкости.

Для приготовления заключающей среды из полистирола удобно пользоваться рецептурами Д.С.Саркисова (70 мл орто - ксилола, 30 г полистирола, 6 мл дибутилфталата) и Р.Д.Лилли (70 мл орто -ксилола, 25 г полистирола и 5 мл дибутилфталата). Для ускорения растворения полистирола смесь можно поместить в плотно закрытой бутыли в термостат (37 °С). Следует отметить, что не все сорта полистирола пригодны для приготовления заключающей среды, поскольку иногда пластификатор при взаимодействии с растворенными в полистироле примесями образует опалесцирующую при застывании взвесь. Для заключения постоянных препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, которые предполагается длительно сохранять в архиве (десятки лет), следует предпочесть канадский бальзам. При работе с препаратами, окрашенными основными анилиновыми красителями, следует использовать полистирол или другую нейтральную заключающую среду (в канадском бальзаме и других природных смолах анилиновые красители быстро выцветают). Если предполагается исследовать полученные препараты с помощью флуоресцентного или лазерного конфокального микроскопов, то использовать заключающие среды на основе природных смол нельзя (они обладают собственной флуоресценцией).

**6. Обезвоживание. Приготовление набора или батареи спиртов возрас­тающей концентрации.**

**Обезвоживание проводят в "батарее"** со спиртами, крепость которых постепенно повышается. Обезвоживание ткани производятся постепенно (чтобы не произошло сморщивания) путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50°, 60\*, 70°, 80°, 90°, 96°, 100°: В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка. Спирты разной концентрации готовят по прилагаемой таблице.

|  |  |
| --- | --- |
| **Для получения 100 мл** | **Объем составных частей** |
| Спирт 96° | H2O | Спирт 90° | H2O | Спирт 80° | H2O | Спирт 70° | H2O |
| 40°45°50°60°70°80°90° | 42475263738394 | 5853483727176 | 445056677889- | 565044332211- | 5056637588-- | 5044372512-- | 57647186--- | 43362914--- |

На практике можно пользоваться упрощенным расчетом: брать количество спирта в миллилитрах, равное крепости требуемого рабочего спирта, и к нему доливать столько воды, чтобы их сумма соответствовала цифре крепости исходного спирта. Например, исходный спирт 96%. Для получения 60% спирта следует к 60 мл исходного спирта долить 36 мл воды. Исходным материалом для получения абсолютного (100%) спирта служит 96% этиловый спирт. Отнятие воды проводят с помощью извести (СаСОз) или обезвоженного медного купороса. Медный купорос (меди сульфат) удерживает 5 молекул кристаллизованной воды. Химически чистый медный купорос прокаливают в стеклянной или фарфоровой посуде, помешивая стеклянной палочкой до получения белого порошка безводной соли. Для обезвоживания 100 мл спирта, налитого в банку с притертой пробкой, туда помещают 10 г обезвоженного медного купороса. В течение 1 — 2 дней банку часто встряхивают. Купорос приобретает голубой цвет. Тогда спирт сливают в новую банку, куда насыпают белый порошок купороса, и продолжают его встряхивать. Если купорос слегка посинеет, то спирт сливают в третью банку с белым купоросом. Если после встряхивания купорос перестанет синеть, абсолютный спирт аккуратно сливают или фильтруют в чистую сухую бутылку и закрывают резиновой пробкой. С помощью свежепрокаленной извести спирт можно обезводить быстрее. Для этого его кипятят с негашеной известью 1—2 ч на водяной бане.

**Обезвоживание проводят** в чисто вымытых и высушенных банках или бутылках с притертыми пробками. Для получения качественных препаратов его необходимо проводить постепенно. Нельзя сразу после промывки водой помещать кусочки в 96% спирт. Если же фиксацию или промывку проводили спиртом, то обезвоживание начинают со спирта более высокой концентрации. Материал последовательно переносят в спирт более крепкий. Время нахождения материала в спиртах зависит от размеров кусочков и характера ткани (1—2 ч для маленьких объектов, 1—2 суток для кусочков толщиной 2 см). Обычно его выдерживают в каждом спирту не менее 24 ч. При переносе кусочков в более крепкий спирт их просушивают фильтровальной бумагой. Спирты быстро загрязняются веществами, которые извлекаются из материала, особенно жиром. Их нужно проверять, смешивая с водой. Если при этом появляется белая густая муть — спирты подлежат замене.

**7. Заливка в парафин. Достоинства и недостатки парафиновой заливки. Приготовление и наклеивание парафиновых блоков.**

Этот метод широко распространен в исследовательских гистологических лабораториях благодаря относительной быстроте заливки (в течение 1—2 дней после обезвоживания), возможности приготовления серийных срезов, а также тонких срезов для цитологических исследований (толщина 2—3 мкм), удобству хранения блоков и неокрашенных срезов (практически неограниченное время).

К недостаткам метода следует отнести значительное сжатие исследуемого материала (до 20%), вызываемое воздействием высокой температуры в процессе пропитывания парафином. Богатые водой, рыхлые ткани малопригодны к заливке в парафин. Известное неудобство представляет необходимость удаления парафина из срезов перед их окраской.

 Парафин при комнатной температуре — твердое гомогенное вещество. Существует несколько сортов парафина: мягкие (точка плавления 45-54С) и твердые точка плавления 58-60С).

В большинстве случаев для заливки применяют парафин с точкой плавления 54-56"С. Если резка предполагается при низкой температуре окружающей среды, то лучше применять парафин с более низкой точкой плавления (48—50°С). Нужная степень твердости парафина достигается смешиванием в различных комбинациях мягких и твердых сортов.

Если точка плавления парафина неизвестна, ее можно определить. Для этого расплавленный парафин насасывают в тонкий стеклянный капилляр и дают ему застыть. Затем очищают капилляр снаружи от приставшего парафина и вместе с градусником опускают в химический стаканчик с водой, которую начинают постепенно нагревать, перемешивая стеклянной палочкой. Как только парафин в капилляре начнет расплавляться, отмечают температуру, которая и укажет точку его плавления.

Следует помнить, что обычный продажный парафин часто содержит газообразные примеси, которые при заливке образуют пузырьки, придающие парафину повышенную ломкость и значительно ухудшающие качество резки материала. Для избавления от этих примесей свежий парафин следует на длительное время оставить в расплавленном виде в плоских чашках (чтобы увеличить площадь для выделения газов) при температуре 70°С (для этого можно приспособить сушильный шкаф). Можно также подвергать парафин частому расплавлению и нагреванию (до появления дыма) с последующим быстрым охлаждением.

Если парафин, несмотря на соответствующую подготовку, сохраняет жесткость, к нему следует добавить чистый пчелиный воск в количестве 2—5%, что придаст парафину большую эластичность.

Заливка в парафин требует тщательного соблюдения двух основных условий:

1) препарат должен быть полностью обезвожен,

2) не должен содержать спирт.

**11. Приготовление гистологических срезов (парафиновых и целлоиди­новых). Приготовление серийных парафиновых срезов. Техника сня­тия срезов с микротомного ножа. Наклейка срезов на предметные стекла, их расправления. Маркировка стекол.**

**Техника приготовления замороженных срезов.**

Замороженные срезы получают с помощью замораживающих микротомов или в криостате. Замораживающий микротом снабжен замораживающим столиком, на котором замораживается объект. В столике имеются камера и приспособление для подачи в камеру углекислоты, соединенное специальным шлангом с баллоном, в котором находится углекислота. Баллон закрепляется вверх дном в вертикальном положении на специальной подставке. Вместо углекислотной установки для замораживания тканей может быть использован термоэлектрический охлаждающий столик (ТОС). Более быстро и лучшего качества срезы можно получить в криостате. Криостат представляет собой холодильник, в котором поддерживается температура минус 5°С - 40°С. Чаще всего рабочей температурой является температура минус 14°С – минус 20°С. В холодильник вмонтированы микротом (криотом), имеется освещение. В передней стенке криостата имеется окошечко, в боковых стенках – отверстия с рукавами для рук оператора. Микротом в криостате обычно ротационный, ткани примораживаются к латунным держателям, держатель фиксируется на специальном стержне.

Микротомный нож закреплен неподвижно, а объект при резке подводится к ножу. Существуют различные методы дальнейшей обработки срезов:

1) срез снимают на теплое (с температурой, равной комнатной) или холодное (с температурой, равной температуре криостата) покровное или предметное стекло и фиксируют в момент таяния;

2) срез снимают на теплое или холодное покровное или предметное стекло, дают ему оттаять и подсушивают на воздухе, после чего он может быть фиксирован или не фиксирован в зависимости от дальнейшего исследования;

3) срез переносят в теплый или холодный раствор реактива (инкубационной среды при гистохимическом исследовании ферментов);

4) срез переносят в банку с теплым или холодным фиксатором;

5) срез подвергают лиофильной сушке.

**Наклейка целлоидиновых срезов на предметное стекло**

Хорошо моют предметные стекла, обрабатывают их спиртом и наносят тонкий слой белка с глицерином. В отличие от Парафиновых срезов при наклейке целлоидиновых нужно смазывать предметные стекла смесью белка с глицерином несколько обильнее и, как правило, не свертывать нагреванием. Стекла покрывают белком с глицерином перед самым наклеиванием срезов. Вначале срезы перед наклейкой помещают в чашку с 50—70° спиртом и на предметные стекла берут их именно отсюда, так как вода смывает смесь белка с глицерином. Свертывания белка в 50—70° Спирте не происходит. Свертывания белка в 50—70° спирте не происходит. Белок свертывается лишь в 96° или абсолютном спирте. Извлекают срез из 50—70° спирта на подготовленное предметное стекло (сразу на середину), тщательно расправляют его, удаляют фильтровальной бумагой вокруг среза избыток спирта и сильно прижимают сухой гладкой фильтровальной бумагой, сложенной в 3—4 слоя. Обрабатывают 96° спиртом в течение 3—5 минут и отжимают фильтровальной бумагой. 4; Снимают фильтровальную бумагу и сразу наливают гвоздичное масло.

**Изготовление срезов и их наклейка**

Для изготовления срезов из парафиновых блоков обычно используются два типа микротомов - санные и ротационные. В нашей стране более распространены приборы с ручным приводом (существуют и автоматизированные микротомы). В настоящее время отечественная промышленность не производит микротомов, отвечающих высоким требованиям, предъявляемым к приборам подобного класса. Наиболее качественные приборы изготавливаются зарубежными фирмами, одной из которых является немецкая фирма PFM. В большинстве лабораторий отдают предпочтение санным микротомам. Они проще устроены, просты в работе и обслуживании и позволяют изготавливать срезы, как с парафиновых, так и с целлоидиновых блоков. Кроме того, санный микротом легко дооснащается замораживающим столиком и приспосабливается для изготовления срезов замороженных тканей.

Ротационные микротомы используют главным образом при необходимости получения тонких (1-3 мкм) срезов и для изготовления серий срезов. При планировании иммуноцитохимических исследований использовать целлоидин - парафиновые методы заливки не рекомендуется из-за частого развития неспецифической фоновой реакции. Ее можно избежать только предварительно удалив из срезов целлоидин. Увеличение времени пребывания в этой среде не сказывается отрицательно на качестве дальнейшей проводки и заливки. На санном микротоме с ручным приводом невозможно стабильное получение парафиновых срезов тоньше 4 мкм, даже при использовании специальных сортов парафина. Как в санных, так и в ротационных микротомах для изготовления срезов могут быть использованы многоразовые ножи (которые можно точить и править) и специальные одноразовые лезвия. При изготовлении срезов их следует снимать с микротомного ножа при помощи кисточки и препаровальной иглы таким образом, чтобы не коснуться режущей кромки ножа. По окончании работы нож следует тщательно очистить от остатков срезов и кусочков прилипшего парафина при помощи тряпочки, смоченной бензином, петролейным эфиром или ксилолом. При загрязнении режущей кромки ее следует промыть бензином, а не вытирать, чтобы не повредить лезвие. Неаккуратное обращение с многоразовым ножом сокращает срок его службы. Следует помнить, что заводская заточка ножа всегда лучше, чем проведенная повторно. Срезы с ножа обычно собирают на дистиллированную воду (реже наклеивают на предметные стекла сухим способом). При снятии срезов на воду для обеспечения хорошего их расправления воду подогревают до 37°-40°С (так, чтобы срезы расправились без подплавления парафина). Расправленные срезы вылавливают на приготовленные предметные стекла. Можно снимать срезы и на дистиллированную воду, помещенную на предметное стекло (обычно по 2-3 капли воды на стекло). В этом случае расправления срезов добиваются, нагревая стекла с плавающими на воде срезами на нагревательном столике или над пламенем спиртовки. В последнем случае следует быть очень внимательным, чтобы не допустить перегрева и расплавления парафина, из-за чего срез может разорваться. Дальнейший перегрев может привести к нарушению тинкториальных свойств ткани. После расправления срезов на стекле излишек воды (вокруг срезов) аккуратно удаляют фильтровальной бумагой и помещают папки с предметными стеклами в термостат (37°С) на ночь. После этого срезы могут быть окрашены.

**Подготовка предметных стекол**

Перед наклеиванием срезов предметные стекла должны быть подготовлены для того, чтобы в ходе дальнейшей обработки срезы не отклеивались. Не требуют специальной подготовки только предметные стекла, обработанные в заводских условиях специальными адгезивами — поли - L-лизином и аминоалкилсиланом. Такие стекла выпускаются рядом зарубежных фирм (Sigma, Dako, Shandon, Menzel и др.). О наличии адгезивного покрытия можно судить по надписи, имеющейся на упаковке предметных стекол. Подготовка предметных стекол к работе состоит из двух этапов — очистки (обезжиривания) и нанесения адгезивного покрытия. В настоящее время российскими производителями предметные стекла, не нуждающиеся в обезжиривании, не выпускаются. На упаковках стекол импортного производства, не нуждающихся в очистке и обезжиривании, должна быть маркировка "рге cleaned".

**Очистка и обезжиривание обычных предметных стекол.**

Сначала предметные стекла тщательно промывают в теплой мыльной воде, прополаскивают в чистой водопроводной (а лучше дистиллированной) воде и насухо протирают неворсистой тканью (лучше льняной). Такие стекла можно завернуть в чистую бумагу и использовать по мере необходимости. Перед работой необходимое количество предметных стекол погружают в эксикатор (или банку с притертой пробкой) с жидкостью Никифорова (этанол-эфир 1:1) или 96% этанолом. В жидкости Никифорова происходит окончательное обезжиривание стекол. Если предметные стекла, поступающие в лабораторию достаточно чистые, можно ограничиться только обезжириванием их в жидкости Никифорова или этаноле. Для проверки качества очистки и обезжиривания на извлеченное из жидкости Никифорова и тщательно протертое сухой тканью предметное стекло нужно поместить каплю дистиллированной воды. Если вода растекается по поверхности стекла, то такие стекла можно использовать, если вода собирается в каплю — очистка стекла недостаточная или свойства поверхности стекла таковы, что срезы могут отклеиваться, даже при последующей обработке адгезивом. Следует отметить, что чем толще срезы, тем они более склонны отклеиваться при дальнейшей обработке. Срезы могут отклеиваться при высокой температуре растворов (что может иметь место в иммуноцитохимических исследованиях и при постановке гибридизации in situ). В щелочных ваннах срезы отклеиваются чаще, чем в нейтральных и кислых.

**Обработка адгезивными средами.**

Адгезивные среды наносятся только на очищенные и обезжиренные предметные стекла. Среди методов увеличения адгезивных свойств предметных стекол следует остановиться на двух, наиболее распространенных. Это - обработка яичным белком с глицерином и обработка желатиной. Лучшую адгезию, чем при использовании этих двух способов, дает применение полилизина и аминоалкилсилана, однако в лабораторных условиях нанесение этих покрытий бывает не всегда успешным, поэтому, при необходимости применения таких адгезивов, лучше заказать импортные предметные стекла, обработанные в заводских условиях.

**Обработка белком с глицерином.**

Берут свежий яичный белок (без примеси желтка), взбивают его шпателем до состояния пены и выливают на большой широкопористый фильтр, смоченный предварительно дистиллированной водой. Фильтрация продолжается около 24 ч. К профильтрованному белку прибавляют равный объем глицерина, размешивают и добавляют кусочек камфары или тимола для предупреждения загнивания. Камфору (или тимол) можно добавить и в белок во время взбивания. Приготовленный белок с глицерином хорошо сохраняется в бытовом холодильнике (несколько месяцев). Обработка обезжиренных предметных стекол белком с глицерином производится непосредственно перед изготовлением срезов следующим образом. Предметные стекла извлекаются из этанола или жидкости Никифорова поочередно, тщательно протираются сухой тканью и раскладываются в необходимом количестве на папках. На каждое предметное стекло кончиком препаровальной иглы или тонкой стеклянной палочкой наносится маленькая капелька белка с глицерином. Подушечкой пальца (сухой) лаборант тщательно растирает капельку по поверхности стекла до ощущения притирания (более высокого сопротивления движению). После этого оставляют стекла в сухом помещении для подсыхания (защитив от пыли), ставят папки на непродолжительное время (15-20 мин) в термостат или проводят каждое стекло над пламенем спиртовки, добиваясь его нагревания до 50°-60°С, после чего стекла готовы для наклейки срезов.

**Обработка желатином.**

Растворяют 2,5 г желатина в 500 мл дистиллированной воды, нагревая раствор до 50°С при постоянном помешивании. После растворения желатина добавляют 0,25 г хромокалиевых квасцов и хорошо перемешивают раствор. Охлаждают раствор до комнатной температуры и хранят при 4°С. Перед использованием раствор нагревают до 60°С и фильтруют. Помещают в раствор очищенные предметные стекла, вынимают и сушат на подставке при 60°С не менее часа. После охлаждения стекла можно использовать или хранить в коробках (для защиты от пыли).

**Подготовка срезов к окрашиванию и последующая обработка.**

Поскольку большинство красителей не проникают в срезы, пропитанные парафином и являются водо - или спирторастворимыми веществами, парафин перед окраской препаратов должен быть удален. Этого достигают в ходе процедуры депарафинирования и регидратации. В качестве растворителя парафина обычно используют орто – ксилол. Для регидратации применяют спирты (этанол) нисходящей крепости. При постановке иммуноцитохимических реакций некоторые фирмы (например Sigma) в своих протоколах рекомендуют перед депарафинированием прогреть предметные стекла в термостате (56 °С). Проводить депарафинирование и регидратацию срезов, наливая ксилол и спирт непосредственно на предметное стекло, как это рекомендует Г.А.Меркулов, не следует, чтобы избежать токсического воздействия паров ксилола. Целесообразно использовать высокие цилиндрические стаканчики с притертыми крышками. Для депарафинирования и регидратации достаточно пяти стаканчиков. В первые два наливают орто - ксилол. Затем следуют две порции 96%-го этанола и 80%-го этанол. В каждой порции ксилола предметные стекла следует оставить на 3-5 минут. В спирты стекла следует помещать на 2-3 минуты. При перекладывании стекол следует аккуратно промокать их торцевую часть о фильтровальную бумагу, чтобы не загрязнять последующие растворы. Депарафинировать и регидратировать предметные стекла, сложенные по два (срезами наружу) не следует из-за опасности занесения ксилола, который может остаться между стеклами, в спирты и воду. Из 80%-го спирта предметные стекла переносят в дистиллированную воду на 5 (или более) минут. На этом регидратация срезов завершается и можно приступать к окраске.

**12. Санный микротом. Основные его конструктивные части, уход за микротомом. Микротомные ножи.**

Для изготовления срезов из парафиновых блоков обычно используются два типа микротомов - санные и ротационные. В нашей стране более распространены приборы с ручным приводом (существуют и автоматизированные микротомы). В настоящее время отечественная промышленность не производит микротомов, отвечающих высоким требованиям, предъявляемым к приборам подобного класса. Наиболее качественные приборы изготавливаются зарубежными фирмами, одной из которых является немецкая фирма PFM. В большинстве лабораторий отдают предпочтение санным микротомам. Они проще устроены, просты в работе и обслуживании и позволяют изготавливать срезы, как с парафиновых, так и с целлоидиновых блоков. Кроме того, санный микротом легко дооснащается замораживающим столиком и приспосабливается для изготовления срезов замороженных тканей.

Ротационные микротомы используют главным образом при необходимости получения тонких (1-3 мкм) срезов и для изготовления серий срезов. При планировании иммуноцитохимических исследований использовать целлоидин - парафиновые методы заливки не рекомендуется из-за частого развития неспецифической фоновой реакции. Ее можно избежать только предварительно удалив из срезов целлоидин. Увеличение времени пребывания в этой среде не сказывается отрицательно на качестве дальнейшей проводки и заливки. На санном микротоме с ручным приводом невозможно стабильное получение парафиновых срезов тоньше 4 мкм, даже при использовании специальных сортов парафина. Как в санных, так и в ротационных микротомах для изготовления срезов могут быть использованы многоразовые ножи (которые можно точить и править) и специальные одноразовые лезвия. При изготовлении срезов их следует снимать с микротомного ножа при помощи кисточки и препаровальной иглы таким образом, чтобы не коснуться режущей кромки ножа. По окончании работы нож следует тщательно очистить от остатков срезов и кусочков прилипшего парафина при помощи тряпочки, смоченной бензином, петролейным эфиром или ксилолом. При загрязнении режущей кромки ее следует промыть бензином, а не вытирать, чтобы не повредить лезвие. Неаккуратное обращение с многоразовым ножом сокращает срок его службы. Следует помнить, что заводская заточка ножа всегда лучше, чем проведенная повторно. Срезы с ножа обычно собирают на дистиллированную воду (реже наклеивают на предметные стекла сухим способом). При снятии срезов на воду для обеспечения хорошего их расправления воду подогревают до 37°-40°С (так, чтобы срезы расправились без подплавления парафина). Расправленные срезы вылавливают на приготовленные предметные стекла. Можно снимать срезы и на дистиллированную воду, помещенную на предметное стекло (обычно по 2-3 капли воды на стекло). В этом случае расправления срезов добиваются, нагревая стекла с плавающими на воде срезами на нагревательном столике или над пламенем спиртовки. В последнем случае следует быть очень внимательным, чтобы не допустить перегрева и расплавления парафина, из-за чего срез может разорваться. Дальнейший перегрев может привести к нарушению тинкториальных свойств ткани. После расправления срезов на стекле излишек воды (вокруг срезов) аккуратно удаляют фильтровальной бумагой и помещают папки с предметными стеклами в термостат (37°С) на ночь. После этого срезы могут быть окрашены.

**13. Гистологические красители: основные, кислые, нейтральные, специ­альные красители.**

Общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов - В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания. Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии 42 протравы, например, гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.

В гистологической практике применяют основные, кислотные и нейтральные красители – Основные, или ядерные, красители — это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются базофильными. К ним относятся гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый и др. Кислотные красители — это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются эозин, кислый фуксин, Конго красный (конгорот), эритрозин. Нейтральные красители: судан - III, судан - IV, метиленовый синий. Процесс гистологического окрашивания условно подразделяют на прогрессивный и регрессивный, прямой и непрямой, простой и сложный. При прогрессивном типе окрашивания процесс идет до тех пор, пока не достигается интенсивное проникновение красителя в ткань. Регрессивный тип основан на первоначальном перекрашивании структур с последующей дифференцировкой до нужного уровня. Если раствор красителя непосредственно действует на ткань, то говорят о прямом окрашивании. Окрашивание после предварительной

подготовки ткани (протравливания) называется непрямым. Окрашивание одним красителем - простое, а при использовании нескольких красителей — сложное.

Окрашивание срезов для обзорных целей - Различают методы окраски для обзорных целей, применяемые для получения общего представления о морфологии ткани или органа, и специальные, предназначенные для выявления определенных элементов клетки или ткани (например, комплекс Гольджи, митохондрий ,эластический волокон соединительной ткани и т.д.). Ниже рассматриваются лишь некоторые методы окрашивания для обзорных целей. Суть их обычно заключается в том, что при этом окрашиваются ядра и каким-то контрастным красителем – цитоплазма.

**День 18 (10.06.2020 г)**

**Задача №1**

На электронограмме представлены две секреторные клетки в одной хорошо развиты гранулярная эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи. Для другой характерны развитая гладкая эндоплазматическая сеть и аппарат Гольджи. Каков секрет этих клеток?

**Ответ:** Для первой клетки характерен белковый секрет, для второй – полисахаридный или липидный секрет.

**Задача №2**

На препарате обнаружены ткани со следующими структурами: а) пласт клеток, тесно прилежащих друг к другу; б) клетки, разделенные межклеточным веществом. Какая из этих структур относится к эпителиальным тканям?

**Ответ:** а) пласт клеток, тесно прилежащих друг к другу;

**Задача №3**

Предложен препарат эпителия, в котором все клетки касаются базальной мембраны, а ядра расположены в несколько рядов. К какому типу относится данный эпителий?

**Ответ:** Многослойный эпителий

**Задача № 4**

Предложено два препарата эпителия. На одном все клетки касаются базальной мембраны, на другом - на базальной мембране лежит базальный слой, а остальные слои расположены друг на друге. К каким типам относятся данные эпителии?

**Ответ:** **Однослойный и многослойный**

**Задача №5**

В железе имеется слой секреторных клеток, имеющих ядро и органеллы, в цитоплазме - гранулы секрета. Признаков отделения апикальной части клеток не обнаружено. По какому типу секретирует данная железа?

**Ответ:** Экзокринная и эндокринная железы.

**Задача №6**

В организме больного начался острый гнойный воспалительный процесс. Какие изменения можно ожидать в гемограмме?

**Ответ:** **Увеличится число лейкоцитов в крови, которые обеспечивают защитные функции организма, благодаря способности к перемещению в сторону химического раздражителя, чем обеспечивают поражение микробов, инородных веществ и участвуют в иммунных реакциях организма.**

**Задача №7**

В рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани нарушено образование межклеточного вещества. Нарушением функции каких клеток может быть вызвано это явление? Какие особенности строения характеризуют эти клетки?

**Ответ:** Фибробластов, фиброцитов, тканевых базофилов.

**Задача №8**

Для изучения предложены два препарата хрящевой ткани (один окрашен гематоксилин - эозином, другой - орсеином). Какие волокна и какой разновидности хрящевой ткани будут выявляться при этих способах окрашивания?

**Ответ:** Гематоксилином и эозином окрашены волокнистая и гиалиновая хрящевые ткани для выявления коллагеновых волокон 1 и 2 типа соответственно, орсеином окрашивается эластическая хрящевая ткань для выявления эластических волокон. Коллагеновые волокна – прочность, эластические волокна – эластичность.

**Задача №9**

Даны два препарата специальных видов соединительной ткани, окрашенных гематоксилин - эозином. В одном из них выявляются соединенные между собой клетки отростчатой формы; в другом - крупные клетки круглой формы с узким ободком цитоплазмы и плоским ядром по периферии клетки. Назовите разновидности специальных соединительных тканей?

**Ответ:** Первая – ретикулярная соединительная ткань, вторая – белая жировая ткань.

Задача №10

Предложены два препарата хрящевой ткани, окрашенные орсеином. В одном из препаратов хорошо видны темно-коричневого цвета волокна. К какой разновидности хрящевой ткани относится этот препарат?

**Ответ:** Эластическая хрящевая ткань ушной раковины.