**Методическая разработка**

**практического занятия для студента**

**Тема занятия:** **«**Лабораторные морфологические исследования**»**

**Значение темы**:

**Морфологические методы исследования (цитологические и гистологические)** -  это изучение клеток и тканей, жидкостей организма под микроскопом с целью определения их природы, структуры для дальнейшей постановки точного диагноза. Часто назначают для установления диагноза и скрининга злокачественных новообразований.

**Цели обучения**:

**Общая цель:**

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

ОК 7. Брать на себя ответственность за работу членов команды (подчиненных), за результат выполнения заданий.

ОК 9. Ориентироваться в условиях частой смены технологий в профессиональной деятельности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 1.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных общеклинических исследований.

ПК 1.2. Проводить лабораторные общеклинические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

**Знать:** основные отклонения в строении клеток и тканей; основные виды биопсии; современные методы морфологических исследований.

**Уметь:** организовывать рабочее место, проводить несложные клинические исследования, проводить дозирование реактивов.

**Оснащение занятия**:

дозаторы переменного объема 10-100, 20-200, 100-1000 мкл, наборы реактивов для лабораторных исследований, наглядные пособия (презентации)

**Контроль исходного уровня знаний:**

1. Что представляет собой морфологическое исследование, его назначение?

2. С какой целью проводят цитологические исследования?

3. Что является предметом исследования цитологического анализа, способы его получения.

4. Назовите виды цитологического исследования и дайте им характеристику

5. Что такое антитела?

6. Назначение гистологического исследования, его отличие от цитологического

7. Назовите этапы гистологического исследования биопсиойого материала

8. Назовите виды диагностической биопсии и дайте им характеристику

**Содержание темы**

**Морфологические** (цитологические и гистологические) **исследования** — это изучение клеток и тканей, жидкостей организма под микроскопом с целью определения их природы, структуры для дальнейшей постановки точного диагноза.

Взятие материала называют биопсией. В зависимости от цели на изучение могут взять небольшое количество биоматериала или более крупные фрагменты тканей.

 **Цитологическое исследование** является методом морфологического подтверждения диагноза, желательного в ряде неонкологических болезней и обязательного для онкологических пациентов.

При цитологии исследуют отдельные клетки или их скопление, поэтому специалистам-патоморфологам нужен очень маленький образец биоматериала. Цитологическое исследование подразделяется на два вида:

**Эксфолиативный** — исследуют частицы биоматериала, которые отслоились самостоятельно, либо организм их выделяет естественным образом. К ним можно отнести мочу, слизь, мокроту, образцы кожи или слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Также эксфолиативный анализ широко применяется в гинекологии. Производят небольшой соскоб с поверхности шейки матки, наиболее известный как мазок Папаниколау. Также при необходимости специалист может отшелушить немного чешуек с поверхности ткани.

**Интервенционный** — малоинвазивная процедура, при которой забирают различные жидкости организма при помощи тонкой иглы. К примеру, могут взять содержимое из кисты или уплотнения под кожей, лимфатического узла, плевральной полости.

Цитологию назначают для установления диагноза и скрининга злокачественных новообразований. Наиболее часто ее применяют в гинекологии для определения наличия патологических изменениях в шейке матки, для обнаружения инфекционных болезней; воспалительных состояний; поражений щитовидной железы; патологий плевральной полости.

В зависимости от жалоб и симптомов цитологию назначает лечащий врач: гинеколог, хирург, пульмонолог и др.

После забора биоматериал отправляют в лабораторию, где специалист-патоморфолог смотрит образцы под микроскопом, определяет их тип, после чего можно поставить точный диагноз. Результаты будут готовы в течение 7–10 рабочих дней.

При цитологическом исследовании подтверждают наличие воспаления, определяют его активность и степень выраженности, во многих случаях указывают на инфекционный агент, вызвавший воспаление, что способствует назначению правильного лечения.

Точно установить природу неопухолевого заболевания согласно международным классификациям с помощью цитологического исследования не всегда возможно, однако более важно, что в цитологии хорошо видно, если начинается злокачественное перерождение клеток, что позволит вовремя направить пациента к врачу-онкологу.



В цитологических препаратах всегда хорошо видно злокачественную природу образования. Уровень современных знаний врачей-цитологов позволяет устанавливать диагноз в соответствии с международными гистологическими классификациями злокачественных опухолей в случае наиболее распространенных заболеваний (рак легких, желудка, кишечника, матки, молочной железы), также как и более редко встречающихся (меланома, лимфомы, рак печени, почек, поджелудочной железы и др.). По результатам цитологического исследования определяют перечень необходимого обследования, планируют виды и объемы лечения, дают предварительный прогноз по исходу заболевания.



**Морфологические исследования:**

При морфологии, в отличие от цитологии, анализируют не отдельное скопление клеток, а более крупные фрагменты тканей. Гистология позволяет визуализировать структуру и характерные изменения, которые происходят в организме во время заболевания.

Гистологический анализ биоптата проводят для точной диагностики, определения тяжести и прогноза течения заболевания. Гистологию используют во многих областях медицины. Но чаще всего ее назначают для заключения при опухолевом процессе.

Она помогает определить:

* доброкачественная опухоль или злокачественная;
* атипичность клеток — насколько они отличаются от здоровых;
* точный диагноз. Для его постановки используют дополнительную иммуногистохимическую диагностику;
* прогноз течения заболевания.

Для гистологии проводят биопсию. Она назначается и как самостоятельная процедура, например при эндоскопии, так и во время хирургической операции.

Диагностическая биопсия предполагает прижизненное взятие части тканей или взвеси клеток определенного органа с целью дальнейшего изучения под микроскопом. Данный метод чаще всего применяется при подозрении на злокачественную опухоль. Биопсия у мужчин, женщин и детей проводится только в том случае, если другим способом подтвердить или опровергнуть диагноз нельзя.

* **Эксцизионная.** Это хирургическая операция по удалению целого органа или новообразования. Часть полученных тканей отправляется затем на гистологическое или цитологическое исследование. Это наиболее масштабный вид биопсии по степени вмешательства.
* **Инцизионная.** Предполагает удаление части патологического новообразования или пораженного органа. Как и эксцизионная биопсия, проводится в условиях операционной.
* **Пункционная**. Заключается в изъятии нужных фрагментов тканей органа/опухоли путем прокола тонкой полой иглой. Процедура проводится амбулаторно.
* **Аспирационная.** Предполагает отсасывание содержимого определенного органа или полости при помощи медицинского шприца. Процедура не требует пребывания в стационаре.
* **Трепан-биопсия**. Заключается в заборе столбика плотной ткани органа/опухоли при помощи трепана — полой трубки с заостренным краем. Процедура проводится в амбулаторных условиях.
* **Скарификационная (поверхностная).** Предполагает срезание тонкого пласта тканей с поверхности патологического новообразования на коже. Процедура проводится амбулаторно.
* **Радиоволновая.** Отличается от других методов способом забора биоматериала: для этого используется радионож. Применяется для получения тканей слизистой оболочки шейки матки. В России для проведения радиоволновой биопсии используется аппарат «Сургитрон». Процедура не требует пребывания в стационаре.

Изъятый биоматериал помещают в специальный контейнер и отправляют его в лабораторию. Далее специалисты проводят специальную подготовку к его изучению: биоптат фиксируют в формалине, заливают парафином. Потом полученный парафиновый блок нарезают на тонкие слайсы, окрашивают специальными реагентами и помещают под микроскоп. Окрашивание позволяет патологоанатомам определить не только наличие определенных клеток, но и их степень мутации, злокачественности и то, к какому опухолевому процессу они принадлежат.

**Видео-манипуляция «Этапы гистологического исследования»** [**https://cloud.mail.ru/public/MkN3/zFBaT5JFv**](https://cloud.mail.ru/public/MkN3/zFBaT5JFv)

Врачи-патоморфологи в своих заключениях могут использовать следующие термины:

* **Гиперплазия** – в образце обнаружены только нормальные клетки (т.е. нет признаков злокачественности), однако их количество значительно превышает норму. Данное состояние может указывать на наличие повышенного риска развития злокачественного новообразования;
* **Атипия** – в образце обнаружены клетки, отличающиеся от нормальный, но не являющиеся злокачественными. Наличие подобных клеток означает повышенный риск развития рака;
* **Дисплазия** – выявлен рост большого количества атипичных клеток в органе. Может быть предраковым состоянием;
* **Карцинома** – в образце обнаружены клетки, являющиеся злокачественными, опухоль происходит из эпителиальных клеток (слизистая оболочка). Данный термин является синонимом слова «рак». Могут использоваться дополнительные уточнения, например «аденокарцинома».
* **Саркома** – разновидность злокачественной опухоли, которая в отличие от рака опухолей исходит не из эпителия, например, слизистых оболочек, покрывающих внутренние полости органов, а из тканей иного происхождения, например костей (остеосаркома), мышц (лейомиосаркома), жировой ткани (липосаркома) и т.д. Саркомам присущи те же клинические характеристики, что и раковым опухолям, они способы к инфильтрирующему росту с разрушением окружающих тканей, метастазированию и т.д. Саркомы могут возникать практически в любой части тела.
* **Лимфома** – злокачественная опухоль из клеток лимфатической системы (лимфоцитов);
* **Лейкоз** – злокачественная опухоль, исходящая из клеток-предшественников нормальных клеток крови, исходящая из костного мозга;

**Самостоятельная работа:**

1. Написать определение терминам – морфологические исследования, биопсия.
2. Записать, что является объектом и предметом морфологического исследования.
3. Заполнить таблицу "Виды цитологического исследования":

|  |  |
| --- | --- |
| Показатель характеристики | Цитологическое исследование |
|  |  |
| Способ забора материала |  |  |
| Вид биоматериала |  |  |
| Пример применения |  |  |

1. Заполнить таблицу "Виды биопсии":

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид биопсии | Сущность методики | Условия проведения |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

1. Записать схему этапов гистологического исследования (просмотр видео манипуляции)
2. Заполнить таблицу "Виды отклонения в строении клеток и тканей":

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид отклонения  | Характеристика  | Заключение о риске развития рака |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

4. Ознакомиться с основными правилами и алгоритмом дозирования.

Точность дозирования напрямую влияет на точность получаемого результата лабораторного исследования. Неправильное положение дозатора, неплотно надетый наконечник, разная температура наконечника и жидкости, несоответствующая глубина погружения наконечника в жидкость и другие факторы приводят к тому, что значительно возрастает погрешность дозирования и как следствие общая погрешность анализа.

В отличие от стеклянных пипеток автоматические дозаторы имеют более высокую точность дозирования, удобны в работе и обеспечивают высокую производительность процесса дозирования. Принцип работы дозаторов воздушного перемещения основан на воздушном вытеснении жидкости. Дозирование происходит за счет увеличения или уменьшения объема воздуха между дозируемой жидкостью и поршнем.

1. Дозаторы воздушного перемещения, работая по принципу воздушного вытеснения жидкости, подвержены ошибкам, связанным с изменениями окружающей среды, особенно температуры и атмосферного давления.

2. Для уменьшения общей погрешности при дозировании
необходимо выбирать дозатор, соответствующий дозируемому объему. Дозирование объемов, близких к максимальным, дает меньшую погрешность. При минимальных дозируемых объемах значения погрешностей резко возрастают. Таким образом, при необходимости
набрать объем 50 мкл, нужно использовать дозатор с максимальным объемом, близким к 50 мкл (дозатор 10-100 мкл, лучше чем 20-200 мкл)

3. Для более точного дозирования не рекомендуется выходить за пределы диапазона дозирования для дозатора переменного объема, даже если позволяет шкала. Дозирование, осуществляемое таким образом, ведет к неопределенной ошибке. И всегда есть риск повредить механический счетчик дозирующего устройства.

4. Особенностью дозаторов воздушного перемещения является то, что между поршнем и жидкостью всегда остается определенный объем воздуха, который действует как упругая пружина. Нарушение герметичности между наконечником и посадочным конусом дозирующего устройства приводит к
изменению объема воздуха внутри дозатора, что служит источником ошибок в процессе дозирования. Поэтому набирать жидкость в пипетку необходимо только при хорошо закрепленном наконечнике.

5. Отклонение от вертикальной оси на 30–40o приводит к превышению объема дозированной жидкости (из-за влияния гидростатического давления), поэтому при дозировании дозатор должен находиться строго в вертикальном положении.

6. Между циклами дозирования и при хранении дозатор должен располагаться в штативе, а не на столе во избежание риска контаминации (загрязнения).

7. Рекомендуется предварительное 3-кратное смачивание наконечника предназначенной для дозирования жидкостью, что приводит к соответствию объемов жидкости в первой и последующих дозируемых пробах.

8. Благодаря предварительному смачиванию наконечника можно уменьшить погрешность, связанную с разницей температур наконечника и дозируемой жидкости.

9. При заборе жидкости глубина погружения наконечника
пипетки должна соответствовать дозируемому объему. Рекомендуемая глубина погружения наконечника в жидкость представлена в таблице.

|  |  |
| --- | --- |
| Дозируемый обьем, мкл | Рекомендуемая глубина погружения, мм |
| 1-100 мкл | 2-3  |
| 100-1000 | 2-4 |
| 1000-5000 | 3-6 |
|  |  |

10. Резкое отпускание поршня дозатора, запрокидывание дозатора с жидкостью в наконечнике может приводить к попаданию жидкости внутрь дозатора. Жидкость остается внутри дозатора и может служить источником перекрестного загрязнения, а также порчи дозатора.

11. Объемы дозирования:

0.01 мл – 10 мкл; 0.02 мл – 20 мкл; 0.05 мл- 50 мкл; 0.1 мл – 100 мкл;

0.2 мл – 200 мкл; 0.5 мл – 500 мкл; 1 мл – 1000 мкл.

**Алгоритм работы с дозаторами**

|  |  |
| --- | --- |
| 1 | Организовал рабочее место (методика, реактивы, штатив для дозатора, дозаторы нужного обьема, наконечники для дозатора, емкость для утилизации наконечников ) |
| 2 | Надел перчатки |
| 3 | Выбрал нужный реактив, открутил крышку, положив ее рядом на столе. |
| 4 | Выбрал дозатор, соответствующий дозируемому объему, близкого к максимальному объёму дозатора. |
| 5 | Установил необходимый объём на дозаторе с помощью операционной кнопки (нельзя устанавливать значение объема за пределы диапазона дозатора) |
| 6 | Выбрал наконечник соответствующий дозатору, плотно надел его на дозатор. |
| 7 | Нажал кнопку дозатору большим пальцем до первого упора, поместил наконечник в жидкость вертикально на глубину 3-4 мм и медленно ее опустил, заполнив жидкостью наконечник |
| 8 | Убрал излишек жидкости о край флакона |
| 9 | Переместил дозатор в пробирку, прислонил к стенке пробирки и медленно выпустил жидкость по стенке пробирки, нажав кнопку дозатора до второго упора, избегая вспенивания и разбрызгивания реактива |
| 10 | Скинул использованный наконечник нажатием большого пальца на удалитель наконечника в емкость для отходов класса Б |
| 11 | Поместил дозатор в штатив |
| 12 | Обработал рабочую поверхность дезинфицирующими салфетками, обработал кончик дозатора спиртовой салфеткой и поместил их в лоток с отходами класса В |

**Задание: провести качественную реакцию на содержание белка в сыворотке крови, оценить уровень белка в двух пробах.**

1. Взять две пробирки, пронумеровать маркером;

2. В две пронумерованные пробирки поместить с помощью дозатора 0,5 мл биуретового реактива;

3. В каждую пробирку добавить по 1 мл дистиллированной воды;

6. Провести разведение сыворотки крови физиологическим раствором (1 к 2 и 1 к 20): для этого в две чистые пробирки вносим по 0,02 мл сыворотки крови, затем в пробирку №1 вносим 0,02 мл физраствора, а в пробирку №2 - 0,4 мл физраствора, тщательно перемешиваем.

4. В пробирку №1 добавить 0,02 мл сыворотки крови в разведении 1 к 2;

5. В пробирку №2 добавить 0,02 мл сыворотки в разведении 1 к 20,

6. Тщательно перемешать пробирки и оценить степень окраски растворов в пробирках №1 и №2

**Подведение итогов.**

**Домашнее задание:** Подготовиться к зачетному занятию.