

Федеральное Государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Красноярский государственный
медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-
Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской
Федерации
Фармацевтический колледж

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Тема: Методы гистологической обработки биопсийного материала в
современных условиях.

по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

Выполнил: Медведь Дарья Игоревна (Медведь)

Руководитель: Догадаева Елена Григорьевна (Догадаева)

Рецензент: Соколов Владимир Дмитриевич (Соколов)
Заведующий организационно-методическим отделом ККПАБ

Работа допущена к защите ЦМК «Лабораторных и санитарно-
гигиенических дисциплин»

Протокол № 9 от «ав» ав 2018 г

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ПРОВЕДЕНИЕ БИОПСИИ.	5
1.1 Техника взятия биопсии.....	5
1.2. Методы исследования биологического материала при биопсии.	7
1.3. Приготовление гистологического препарата.	9
1.4. Методы окрашивания гистологических препаратов.	12
1.5. Современные методы морфологического исследования материала: ..	14
1.6. Артефакты, возможные в гистологической лаборатории при приготовлении препаратов.	16
ГЛАВА 2. САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ ПРОВЕДЕНИЕ БИОПСИИ.	21
2.1 Количество проведенных биопсий в Красноярском крае за последние три года.....	21
2.2 Анализ проведенных исследований биопсийного (операционного) материала за 2015- 2017 гг.	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	25
ПРИЛОЖЕНИЕ А	27
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	29

ВВЕДЕНИЕ

Биопсия — представляет собой диагностический метод исследования, заключающийся в иссечении тканей определённого органа или взятие взвеси клеток, проводящийся в живом организме, с целью последующего микроскопического изучения, осуществляемого после обработки препарата специальными красителями. Биопсия является одним из наиболее востребованных исследований, используемых в диагностике большинства онкологических заболеваний.

В настоящее время, благодаря современным технологиям, возможно получение биоптата из любого интересующего органа или участка ткани организма. Можно смело утверждать, что биопсия используется не только в целях диагностики заболевания, но и в лечебных целях в таких областях медицины, как онкология, хирургия, гастроэнтерология и др.

Цель: изучение методов гистологической обработки биопсийного (операционного) материала в современных условиях.

Задачи:

1. Изучить теоретические основы методов обработки биопсийного (операционного) материала в современных условиях.

2. Самостоятельно провести взятие биопсийного (операционного) материала, окрасить, приготовить препарат.

3. Проанализировать статистические данные при различных онкологических заболеваниях по Красноярскому краю за три года.

Предмет исследования: биопсийный (операционный) материал.

Объект исследования: ткани трупа и живых людей.

База: КГБУЗ «Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро»

Методы исследования: изучение и анализ научно- исследовательской и учебной литературы, нормативно - правовой документации, гистологических исследований, а также статистическая обработка результатов. Материалом для написания дипломной работы послужила учебная литература, изучение статей

и работ авторов М.И.Авдеева, В.К. Анреп, В.Л. Быкова, М.И. Касьянова, С.Л. Кузнецова и других, а так же электронные ресурсы и статьи.

Структурно работа состоит из введения, двух глав и заключения. Во введении отображена актуальность данной проблемы, также цели и задачи исследования. В первой главе проведен литературный обзор, даны основные понятия об биопсии, и ее современных методах исследования.. Вторая глава представлена практической частью, в которой содержатся план проведения эксперимента, характеристика методов экспериментальной работы, обоснование выбранного метода, основные этапы эксперимента, обработка и анализ результатов опытно-экспериментальной работы. В заключение дипломной работы мной были сделаны основные выводы по работе, раскрывающие задачи. В приложении предоставлены результаты исследования, характеристика используемого оборудования.

ГЛАВА 1. ПРОВЕДЕНИЕ БИОПСИИ.

1.1 Техника взятия биопсии.

Виды биопсий:

- Эксцизионная биопсия – представляет собой удаление целого органа или патологического образования, осуществляемое во время хирургического вмешательства. Является наиболее масштабным видом биопсии.
- Инцизионная биопсия – удаление только поражённой части органа или части патологического образования, осуществляемые также во время хирургического вмешательства.
- Пункционная биопсия – изъятие некоторых интересующих фрагментов либо столбика ткани, производимое путём прокола ткани тонкой полрой иглой.
- Аспирационная биопсия – заключается в отсасывании содержимого определённого органа или полости организма посредством обычного медицинского шприца. Наиболее быстрый, доступный и безболезненный метод биопсии.
- Эндоскопическая биопсия – забор материала, осуществляемый с использованием оптического прибора – эндоскопа.
- Трепан биопсия - при помощи специальной толстой иглы этим способом проводится забор костных материалов, печени почек и молочных желез.
- Путём Кюретажа - выскабливание внутренних стенок (матки, полостей)

Биопсия является одним из наиболее достоверных и эффективных методов исследования, применяемых для выяснения клеточного состава исследуемой ткани. Исследование полученного биоптата под микроскопом позволяет определить точную цитологическую структуру исследуемого материала, даёт доктору конкретную информацию о наличии заболевания, характере патологического образования, степени «повреждений».

Использование в медицинской практике такого метода как биопсия даёт возможность обнаружить патологию на ранней стадии её развития и предотвратить развитие многих серьёзных заболеваний.

Важна биопсия и тем, что используется для установления объёма оперативных вмешательств у пациентов, страдающих онкологическими заболеваниями.

Показания к проведению биопсии:

Наиболее важными причинами для проведения биопсии являются:

- установление или подтверждение диагноза;
- установление стадии опухоли;
- последующий контроль;
- ведение научной документации.

Проведение биопсии показано в тех случаях, когда результатов других не инвазивных методов исследования недостаточно для подтверждения предварительного диагноза заболевания. В большинстве случаев такими заболеваниями являются доброкачественные и злокачественные опухоли. В настоящее время биопсия пользуется большим спросом в диагностике неонкологических заболеваний. Наиболее часто используется в гастроэнтерологии и гинекологии. Кроме этого, биопсия необходима для определения характера и степени тяжести заболевания при поражении таких органов как почки, печень, повреждении нервной, сосудистой и мышечной систем.

Техника проведения биопсии.

Пункционная биопсия чаще проводится амбулаторно, а также может быть выполнена стационарно.

Обычно мало инвазивные процедуры под визуализационным контролем, такие как пункционная биопсия, выполняются с участием опытного радиолога или УЗИ-лога.

Область введения биопсийной иглы обезболивается с помощью местного анестетика, затем проводится пункционная биопсия.

В случае проведения биопсии детям, особенно маленького возраста, пункционная биопсия может быть выполнена под общим наркозом, что делает процедуру более комфортной как для ребенка, так и для врача.

Если исследование проводится под контролем флюороскопии, УЗИ, то во время процедуры пациент лежит или стоит перед экраном.

При биопсии под контролем КТ или МРТ положение пациента горизонтальное.

Применение томографии позволяет определить точную локализацию патологического образования и наиболее безопасный путь введения иглы. После обнаружения очага точка введения иглы отмечается с помощью маркера. С кожи тщательно удаляются волосы, проводится ее обеззараживание, накладывается стерильная хирургическая простыня.

В месте введения биопсийной иглы проводится крошечный прокол кожи. Под визуализационным контролем врач вводит иглу через кожу, продвигает ее к подозрительному участку и забирает образец ткани. Полноценный анализ может потребовать нескольких образцов, желательно не только из патологического участка(опухоли) , но и на границе с непораженными тканями, капсулы.

После окончания процедуры игла извлекается, проводится остановка кровотечения, и на рану накладывается давящая повязка. Наложение швов не требуется.

1.2. Методы исследования биологического материала при биопсии.

Существует два вида таких методов исследования :

1.Цитологическое исследование.

Цитологическое исследование используется только при диагностических манипуляциях в женских консультациях, гинекологических, эндоскопических, хирургических и иных отделениях, кабинетах для направления клеточного

материала в виде мазков или биологических жидкостей на диагностическое цитологическое исследование

Цитологическому исследованию подлежат любые жидкости и прочий клеточный материал, в виде мазка или мазка-отпечатка получаемый при диагностических или лечебных манипуляциях (операциях):

- Эндоскопические браш-биопсии
- Пункционные тонкоигольные биопсии (пунктаты)
- Мазки-отпечатки
- Соскобы
- Промывные воды
- Секреты желез
- Экссудаты
- Транссудаты
- Содержимое кистозных полостей

2.Гистологическое исследование.

Гистологическому исследованию подлежат любые ткани, получаемые при диагностических или лечебных манипуляциях (операциях):

- Эндоскопические биопсии
- Пункционные толстоигольные биопсии
- Трепан-биопсии
- Ткани, иссечённые во время операций
- Соскобы
- Самопроизвольно отделившиеся фрагменты тканей Ткани, полученные при родах и абортах
- Органы или ткани, полученные во время операции

При взятии материала следует принимать все возможные меры по минимизации механических, термических, химических и других повреждений.

1.3. Приготовление гистологического препарата.

Для приготовления гистологического препарата, ткань должна пройти через ряд этапов обработки материала, таких как:

1.Фиксация:

Целью этого процесса является закрепление тканевых структур в том состоянии, в котором они находились при жизни и предохранение от дальнейшего разрушения. Такое закрепление структур достигается осаждением (коагуляцией) белков. Для фиксации желательно использование емкостей с широким горлом, позволяющим свободно извлекать материал. Объем фиксатора должен превышать объем фиксируемых кусочков в 10-20 раз. Обычно фиксацию проводят при комнатной температуре (18-22градуса) в течение 24 часов. Основным широкодоступным универсальным фиксатором является формалин. Формалин должен быть нейтральным (т.е. забуференным до pH 7.0), так как в кислом формалине заметно ухудшается последующая окраска гематоксилином. Критерием достаточной фиксации служит равномерное уплотнение объекта и одинаковый вид его, как с поверхности, так и на контрольном разрезе. Объекты после фиксации подвергаются дальнейшей обработке.

2.Промывка вырезанных тканей:

Вырезанные кусочки тканей промывают в проточной воде в течении 6-12 или 24 часов.

3.Обезвоживание тканей:

Цель этого процесса подготовить ткань к пропитыванию парафином. Самым распространённым способом обезвоживания, является применение батареи из спиртов восходящей крепости. В ряд спиртов восходящей концентрации входят 70 -80 -95% спирты. Необходимо помнить, что спирт низкой концентрации мацерирует материал, высокой - переуплотняет его. Поэтому концентрацию спиртов увеличивают постепенно. Особенно необходимо, следить за чистотой 95 %- ного спирта, своевременно меняя его

по мере загрязнения и содержания в нем растворенных жиров. Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах в среднем 48 часов и это зависит от характера материала (ткани содержат жир, кровь) и размеров кусочков и количества обрабатываемого материала. Время пребывания в спиртах зависит и от методики обработки тканей, может длиться от 3-х до 24 часов в каждой порции.

Для пропитывания вырезанных кусочков парафином, такое обезвоживание носит лишь подготовительный характер. Это обстоятельство объясняется тем, что парафин не растворяется в спирте. Поэтому необходимо провести ещё дополнительную обработку, а именно: поместить в такую среду, которая, с одной стороны обладает способностью растворять спирт, а с другой стороны, является хорошим растворителем парафина. Такой средой является бензол, хлороформ, толуол или ксилол. Материал, обработанный хлороформом (или в одном из выше указанных реактивов), в дальнейшем легко пропитывается парафином. Для постепенного и более лучшего пропитывания парафином, кусочки из хлороформа переносят в расплавленную смесь парафина и хлороформа («каша») и оставляют в ней при температуре 37 – 40 градусов (в термостате) на 6 -12 часов. Из «каши» кусочки помещаются в расплавленный парафин. Пропитывание в парафине проходит в двух (трех) порциях в термостате, установленного на 2-3 градуса выше точки плавления парафина (56- 58⁰ C). Время пребывания в парафине определяется характером ткани и толщиной кусочков и колеблется от 30 мин. до 2-3 часов. После этого производим заливку материала парафином с 5 %-ым содержанием воска, который предварительно хорошо разогревается на водяной бане. Воск добавляется для эластичности и мягкости парафина, что облегчает дальнейшую резку материала на микротоме.

4.Заливка в парафин

Заливка материала в специальные формочки («кораблики») или кассеты для заливки. Материал, залитый, парафином охлаждается, затем вырезаются блоки, соответственно с заключенным в него объектом.

Полученные парафиновые блоки наклеиваются на деревянные колодки той стороной, на которой больше парафина. Для этого парафиновый блок прикладывают к деревянной колодке и проводят между ними горячим шпателем. Дополнительно, для большей прочности, оплавливают края парафинового блока ещё и по окружности.

5.Микротомирование

Приготовление тонких срезов, необходимых для исследования под микроскопом достигается резкой кусочков залитых в парафин на микротоме. Парафиновый блок (на колодке) прочно укрепляют в объектодержателе микротома, по возможности горизонтально. Затем, укрепляют нож либо перпендикулярно к длиннику микротома (для получения ленты), либо немного косо: последнее положение более показано для резки плотных объектов (кожа, фибромы). После установки ножа приступают к выравниванию поверхности блока, это достигается путём срезания толстых срезов. После того, как поверхность блока будет выровнена и будет виден исследуемый кусочек ткани, переходят к получению срезов желаемой толщины, что определятся соответствующей установкой микрометрического винта. Толщина парафиновых срезов колеблется от 3 -5 микрон.

Наклеивают парафиновые срезы на чистые обезжиренные предметные стёкла, смазанные сывороткой. Так как срезы при наклейке вбирают воду, то во избежание недоразумений при дальнейшей обработке (т.е. окраске), необходимо их тщательно просушить в термостате при температуре 37 -40 °C не менее двух часов. Только после этого можно приступить к окраске.

Недостаточно высушенные и зафиксированные на лабораторном стекле срезы, могут легко отклеиться во время окраски. Критерием хорошо высушенных срезов является приобретение или большей прозрачности по сравнению с беловатыми плохо просушенными срезами. Для того чтобы срезы прочно приклеились к предметному стеклу и не отстали во время окраски. Стеклянные предметные стекла основательно моют в горячей мыльной воде или длительно кипятят в мыльном растворе, затем хорошо ополаскивают в проточной воде ,

обезжиривают . Обработанные предметные стекла хранят в смеси спирта и эфира, откуда их по мере необходимости вынимают пинцетом , протирают. Перед самой наклейкой срезов, высушенные стекла покрывают тонким слоем смеси сыворотки крови с формалином и дистиллированной водой или натирают белком с глицерином.

При изготовлении микропрепаратов, рекомендуется делать 3-4 среза с каждого блока на одно стекло, для одной методики гистохимической окраски. При необходимости изготовления серийных срезов удобнее всего пользоваться лентами из 10 -12 срезов в каждой. В дальнейшем желательно с соблюдением очередности серийных срезов, рекомендуется их обработка по методикам, в зависимости от получаемых результатов в необходимом объеме. Чаще всего приходится делать серийные срезы на разной «глубине» залитого блока, при исследовании сосков эндометрия, при исследовании бронхобиопсий, гастробиопсий и нефробиопсий.

1.4. 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. Гематоксилин становится пригодным только после созревания, процесса окисления и этот процесс можно ускорить с помощью алюмокалиевых квасцов, хрома или железа и др.

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 переокрашивании 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.

Все красители, используемые в гистологической технике, подразделяются на 4 типа.

Тип красителя	Пример	Окрашиваемые структуры
Кислые красители	Кислоты и кислые соли: а) эозин б) кислый фуксин.	а) Окрашиваемые структуры называются оксифильными (имеющими сродство к кислым красителям). б) Это белковые компоненты цитоплазмы и неклеточные структуры (например коллагеновые волокна).
Основные красители	Основные соли: а) гематоксилин (точнее, продукт его окисления - гематеин); б) азур 2, кармин.	а) Красящиеся структуры – базофильные. б) Это структуры, богатые нуклеиновыми или другими кислотами - ядра, рибосомы, аморфный компонент межклеточного вещества.
Нейтральные красители	Смесь двух красителей: основного (азур 2) и кислого (эозин).	а) Структуры, воспринимающие кислые красители, окрасятся эозином; пример - специфические гранулы в эозинофильных лейкоцитах. б) Ядра всех клеток окрашиваются азуром 2.
Индиifferentные красители	Судан III, судан IV	Суданом окрашиваются жировые капли (в которых он растворяется).

1.5. Современные методы морфологического исследования материала:

Методы иммуногистохимических исследований очень важны при определении опухолевого роста, а так же для дальнейшей химиотерапии. Одним из направлений этого метода, является определение рецепторов эстрогенов и прогестерон при опухолях молочной железы.

При раке молочной железы экспрессия рецепторов к эстрогенам и прогестеронам в опухоли может быть благоприятным прогнозом течения опухолевого процесса и положительным ответом на эндокринную терапию.

Иммуногистохимия – относительно простой метод. Преимуществом этого метода является: небольшое количество ткани, требуемое для исследования и локализации рецепторов в малоклеточных опухолях. Методика применяется на фиксированном формалином и залитом в парафин материале,

используется методика высокотемпературной демаскировки антигена. Фиксацию ткани рекомендуется проводить в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. На стекла покрытые адгезивным раствором (для предотвращения отставания срезов), нарезаются срезы по одному на каждое исследование. Затем проводят окраску срезов в соответствии с методикой.

Оцениваются результаты под микроскопом, при положительном окрашивании эстрогеновых или прогестероновых рецепторов, метка располагается в ядре клетки. Ориентировочная система подсчета основана на средней интенсивности ядерного окрашивания на нескольких срезах.

Жидкостная цитология - это инновационный метод цитологического исследования, «золотой стандарт» диагностирования неоплазий слизистой оболочки канала и влагалищной части маточной шейки, который применяется при подозрении у пациентки на рак или дисплазию. Благодаря такому способу диагностики можно обнаружить рак на самых ранних стадиях развития, что увеличивает шансы на полное излечение.

После забора мазка на онкоцитологию биологический материал помещается в определенную жидкую среду. С помощью специальной центрифуги происходит «отмывание» клеток (цитопрепаратов), которые концентрируются в одном месте и образуют ровный слой. В данном случае заключение врача-цитолога будет более точным и информативным, нежели при обычной цитологии, когда материал, взятый для исследования, сразу же наносится на медицинское стекло для анализов.

Оборудование для жидкостной цитологии – это автоматический процессор, выполняющий операции по изготовлению цитопрепарата с помощью четко заданной программы. Повышению качества исследования способствует равномерное распределение цитопрепарата на специальном слайде-стекле.

Для анализа применяется определенный объем биоматериала, после чего клетки проходят через вакуумный фильтр, очищаясь от таких загрязнений, как

слизь и кровь. Для проведения дальнейшей микроскопии на предметное стекло помещается однородный слой клеток. Размещенный на стекле-слайде очищенный препарат обеспечивает более высокую точность, как самого процесса исследования, так и полученного результата.

Флуоресцентная гибридизация, иначе именуемая ФИШ (FISH) – генетический тест, дающий представление о природе опухоли. Изучая новообразование методом ФИШ, врач узнает, является ли рак положительным или отрицательным по отношению к гену HER2. Присутствующие в клетках организма копии гена стимулируют рост атипичных раковых клеток. После пройденной диагностики, врач сможет составить наиболее детальный план лечения.

Определение специфических ДНК-последовательностей на хромосомах проводят на гистологических срезах биоптатов или операционного материала. В практическом исполнении FISH-реакция выглядит следующим образом: исследуемый материал, содержащий ДНК в ядрах меланоцитов, подвергается обработке для частичного разрушения ее молекулы с целью разрыва двухцепочной структуры и тем самым облегчения доступа к искомому участку гена. Пробы классифицируются по месту присоединения к молекуле ДНК. Материалом для FISH-реакции в клинической практике служат парафиновые срезы тканей, мазки и отпечатки.

1.6. Артефакты, возможные в гистологической лаборатории при приготовлении препаратов.

Артефакты, часто встречаемые в гистологической лаборатории, имеются на каждом ряде этапов обработки биопсийного материала.

Артефакты, которые могут быть при фиксации биопсийного (операционного) материала:

1. Необходимо проверять качество фиксирующей жидкости и оценивать соблюдение общих правил фиксации в части размера образцов,

размера контейнера и размера фиксирующей жидкости. Недостаточное внимание должной фиксации образцов ткани часто приводит к дефектам гистологической обработки.

2. Дефекты фиксации образцов обнаруживаются при вырезке. Как правило, в глубине больших кусочков, и отличаются от поверхностных слоев ткани красноватым оттенком окраски. Если такие участки захватывают область интереса, то в них могут появиться дефекты дальнейшей гистологической обработки, а при микроскопии обнаруживаются аутолитические изменения тканей.

3. Для фиксации тканей необходим раствор формалина, забуференный при pH 6.8-7.0. Не рекомендуется использовать кислый формалин, т.к. он приводит к образованию в ткани «формалинового пигмента» бурого цвета, вследствие взаимодействия с гемоглобином. В качественных гистологических препаратах формалинового пигмента не должно быть.

4. Неудаление с поверхности инструментов остатков биологического материала при вырезки, может стимулировать к появлению различных эктопий при переносе микрочастиц с одного органа на другой.

5. Кассеты не следует переполнять образцами – таким образом, обеспечивается наилучший доступ реагентов и предотвращается искажение формы образца. Если образец слишком велик – необходимо использовать вторую кассету. Если в кассеты кладется слишком большое количество образцов – это затрудняет доступ реагентов и приводит к деформации кусочков.

Артефакты, которые могут быть при проводке биопсийного (операционного) материала:

1. Слишком длинная программа для маленьких (например, эндоскопических) биопсий или слишком короткая для крупных образцов, особенно содержащих жировую ткань (молочная железа и др.), может привести к дефектам проводки материала.

2.Остатки формалина при недостаточном его отмывании способствуют задержке в тканях капель воды, не удаляемых при процедуре дегидратации - в этих участках не будет полноценного пропитывания парафином. Поэтому не следует произвольно укорачивать время отмывки после формалина.

3.Для оптимальной проводки и получения качественных микропрепаратов ткань должна быть хорошо зафиксирована. Если после неполной фиксации образцы ткани при проводке попадают в спирт, то возникает феномен зональной фиксации (формалиновая фиксация по периферии образца, спиртовая фиксация в центре).

4.Для проводки ткани следует выбирать соответствующий тип кассет, чтобы избежать дополнительной деформации, сдавления или утраты образцов. Во время проводки фрагменты ткани сжимаются и могут продавливаться через слишком большие отверстия кассеты в растворы для проводки или в другую кассету. Не следует исходить из принципа «один размер кассет подходит для любых образцов»

Артефакты, которые могут быть при заливке биопсийного (операционного) материала:

1.Парафин следует наливать в хорошо прогретую заливочную форму, иначе он преждевременно застынет, что влечет за собой неравномерное застывание парафина в блоке, появление трещин в толще блока и в окружности кусочка. Если этот дефект обнаруживается во время микротомии следует заливочную форму с кусочком на некоторое время оставить на горячей плате заливочного комплекса до полного растопления парафинового ореола, и только после этого продолжить монтаж основания блока. Если кусочек при переносе из кассеты в заливочную форму долго находится на воздухе, парафин на его поверхности застывает, и при перемещении в парафин не успевает полностью расплавиться. В результате, вокруг кусочка формируется зона неравномерного застывания парафина в виде мутного ореола с трещинами.

Артефакты, которые могут быть при микротомии биопсийного (операционного) материала:

1. Для микротомии всегда следует использовать острые лезвия высокого качества. При использовании тупых ножей, грубой микротомии с применением слишком мягких заливочных сред может произойти смещение костных балок, коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон, что обусловлено изменением их направления и механической ориентацией по ходу ножа.

2. Отклеивание срезов от предметного стекла может происходить при подготовке к окраске и во время процедуры окрашивания. Это может быть связано с недостаточным прилипанием срезов к предметному стеклу. Наиболее частыми причинами являются недостаточное высушивание срезов после микротомии, или толстые срезы или использование некачественных предметных стекол.

3. Температура высушивания срезов в сушильном аппарате должна быть 51-52°C. При такой температуре срезы достаточно быстро высыхают, но парафин не плавится. Если температура в сушильном аппарате превышает рекомендованные значения, это может вызывать появление так называемых «тепловых пятен» и участков неравномерного окрашивания препарата, связанных с плавлением парафина и пережиганием самого тканевого среза.

4. Вибрирующие колебания плохо зафиксированного ножа на микротоме приводит к изготовлению срезов разной толщины и неравномерной их окраске, что изменяет свойства тканей. Зазубрины ножа образуют полосовидные разрывы тканей, складки, трещины, и сдвиги. Разрывы тупой бритвой тканей симулирует диапедезные кровоизлияния. В отличие от истинных диапедезных кровоизлияний этот артефакт говорит о одностороннем расположении эритроциты около сосуда и их деформацией. Недостаточная фильтрация красящих веществ приводит к осадочной массе краски в виде клякс темно-синего и оранжевого цвета, которые напоминают колонии микробов, очаги кальциноза, глыбы гликогена.

Артефакты, которые могут быть при окраске биопсийного (операционного) материала:

1. При подготовке срезов к окраске необходимо всегда

добиваться полной депарафинизации препаратов. При не полной депарафинизации препаратов на стеклах остаются участки парафина, обуславливающие их гидрофобность по отношению к водным растворам красителей. В результате в препаратах появляются неокрашенные или неравномерно окрашенные участки срезов.

2. Перед окрашиванием препараты следует тщательно отмыть от остатков ксилола и спиртов довести до воды. Не полностью отмытые от ксилола и спиртов препараты загрязняют раствор гематоксилина, что приводит к снижению качества окраски.

3. Что бы, не было микроорганизмов, загрязняющих растворы красителей, и осаждающихся на препаратах, следует своевременно менять красящиеся растворы или добавлять в них антибактериальные препараты, такие как тимол, ментол или метиолат.

ГЛАВА 2. САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ ПРОВЕДЕНИЕ БИОПСИИ.

2.1 Количество проведенных биопсий в Красноярском крае за последние три года.

Я проходила преддипломную практику в КГБУЗ «ККПАБ» г. Красноярск.

Присутствовала на проведении 13 биопсий. Помогала врачам патологоанатомам в вырезке биопсийного материала и проводила исследование гистологических препаратов. Всего мною было сделано 22 биопсийных (операционных) препарата.

Были изучены статистические данные проведения биопсий в Красноярском крае за 2015- 2017гг и сделаны сравнительные диаграммы:

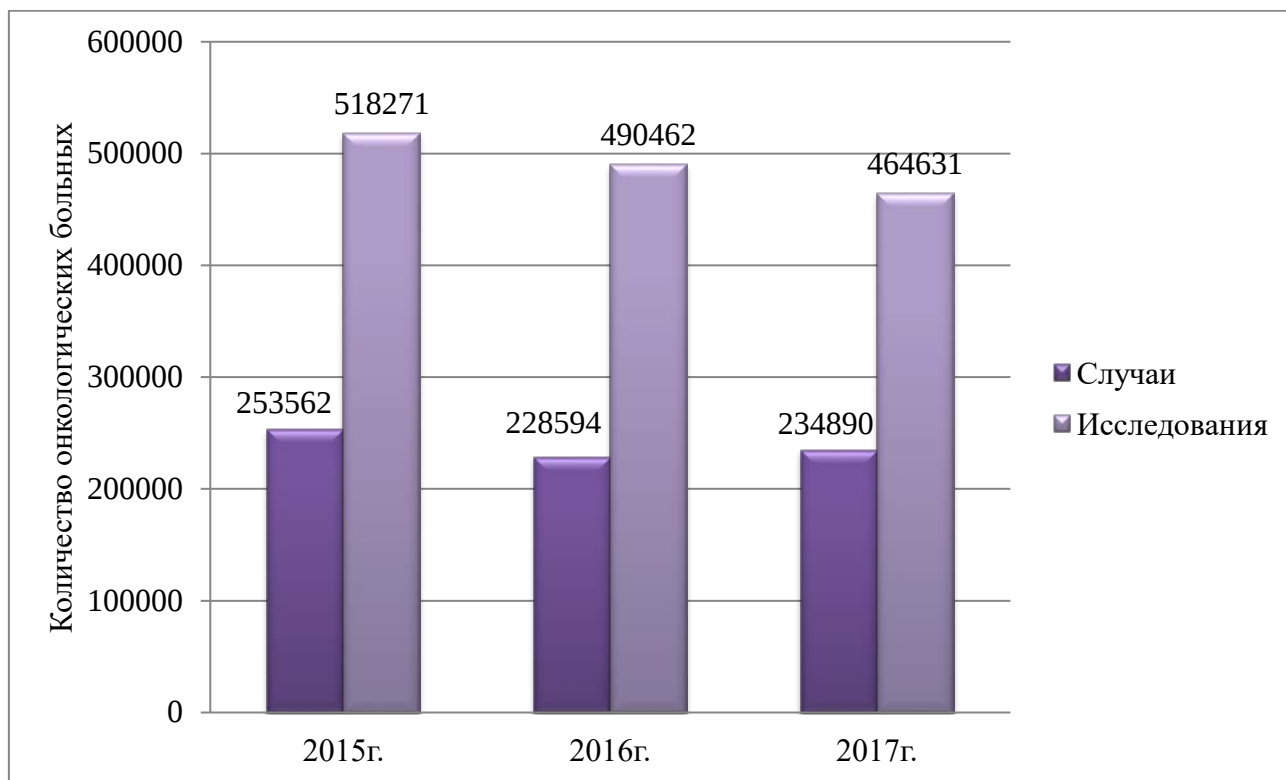


Рисунок 1 - Число случаев и исследований биопсийного (операционного) материала в ПАО и КДЛ Красноярского края за последние три года.

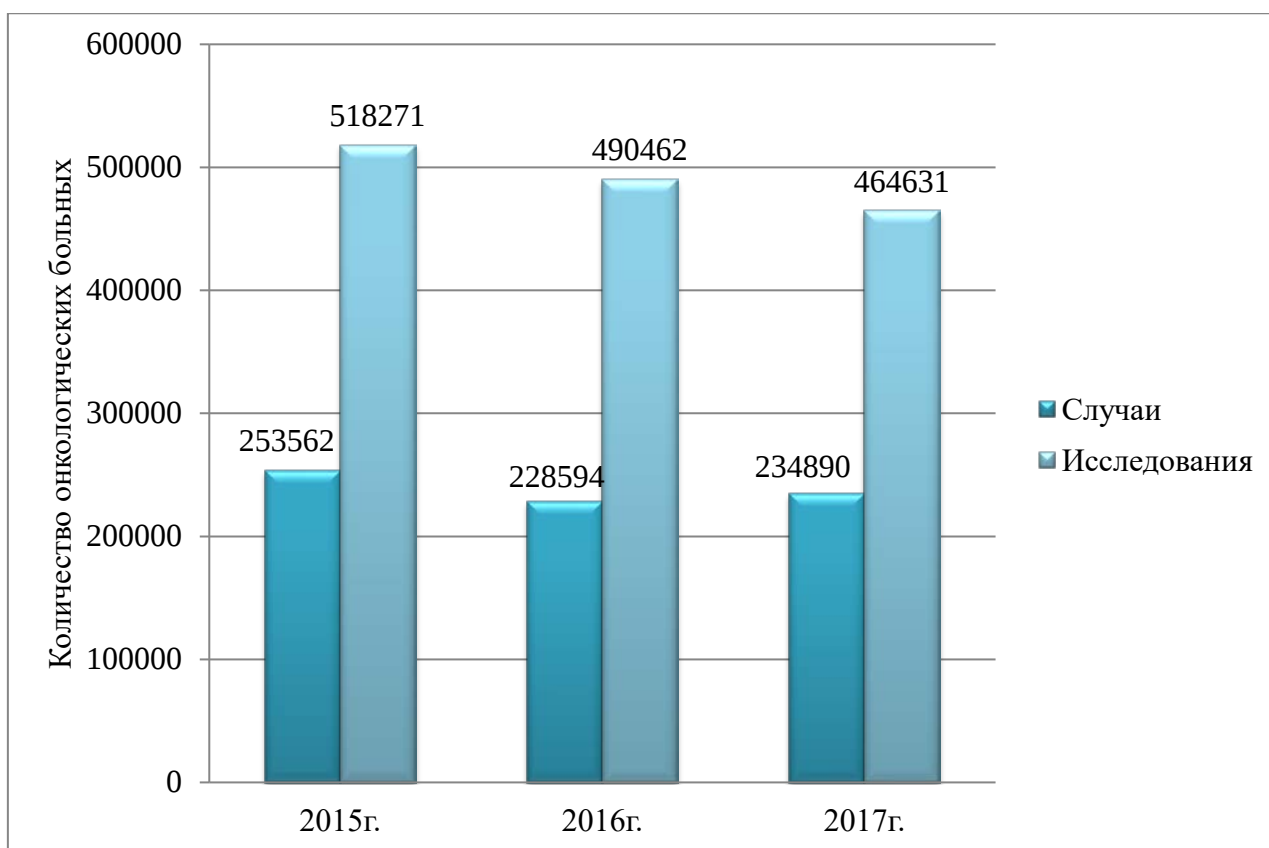


Рисунок 2 - Число случаев и цитологических исследований в ПАО и КДЛ Красноярского края за последние три года

Проанализировав данные рисунков 1, 2 можно сделать выводы, что количество исследований биопсийного (операционного) материала снижается, а количество исследований случаев (пациентов) остается на одном уровне.

2.2 Анализ проведенных исследований биопсийного (операционного) материала за 2015- 2017 гг.

Таблица 1 - Количество случаев исследования биопсийного (операционного) материала в ПАО №2 КГБУЗ ККПАБ для клинических отделений КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского» за последние три года.

№	Характер исследованного материала	2015 г.	2016 г.	2017 г.
		Случаи (в абсолютных цифрах)		

1	Молочная железа	254	475	1563
2	Предстательная железа	670	710	744
3	Прямая кишка	670	786	543
4	Желудок	567	575	412
5	Бронхи и легкие	888	986	792
6	Мочевой пузырь	554	670	653
7	Лимфоузлы	659	746	193
8	Тело матки	339	303	268
9	Почки	503	479	475

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании всего вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

1. Анализ литературных источников позволил детально изучить методику приготовления гистологического препарата.
2. Итог практической части - самостоятельно приготовленный биопсийные препараты.
3. Анализ статистических данных показал, что лидирующими заболеваниями в:
 - 2015 и 2016 гг. являются злокачественные онкологические новообразования бронхов и легких, предстательной железы и прямой кишки.
 - 2017 г. являются злокачественные онкологические новообразования молочной железы, бронхов и легких и предстательной железы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1.Автандилов Г.Г. Основы патологоанатомической практики - СПб., 2014г.стр. 22
- 2.Авдеев М. И, Курс гистологической медицины. - М., 2013.стр 35-38
- 3.Быков В. Л, Цитология и общая гистология. — СПб.: СОТИС, 2014, стр. 13-14
- 4.Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой - М., 2015г.стр. 12-13
- 5.Карпищенко А.И., Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы : рук. для врачей – М., 2014 стр. 235-256
- 6.Касьянов М. И, Очерки медицинской гистологии. - М., 2015,стр. 22-24.
- 7.Коржевский Д.Э., Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов - М., 2015г., стр. 34-38
- 8.Кузнецов С.Л, Мушкамбаров Н.Н, Гистология, цитология и эмбриология – М., 2016, стр. 120- 123
- 9.Малькова П.Г., Франка Г.А. Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике – М.,2014 стр. 12-44
- 10.Меркулова Т.А., Курс патолого-гистологической техники - М.,2013г.стр. 28-32.
- 11.Науменко В. Г, Митяева Н. А, Гистологический и цитологический методы исследования в гистологии (руководство). -М., 2014, стр. 25-41.
- 12.Пальцев М.А., Мальков П.Г., Франк Г.А. Журнал Архив патологии. Руководство Стандартные технологические процедуры при морфологическом исследовании биопсийного и операционного материала - М., 2014г. Стр. 24-26
- 13.Рыков В.А. Соколов В.Д. Организация работы патологоанатомической службы, обязанности и меры социальной защиты работников, - Крск 2016 г. стр. 41-67
- 14.Юрина Н. А., Радостина И.А. Гистология : учебник - М. : Альянс, 2016г. стр 256

15.Биопсия. [Электронный ресурс] - Режим доступа:
<http://www.tiensmed.ru/news/biopsiya1.html> Загл. с экрана

16.Биопсия. [Электронный ресурс] - Режим доступа:
<http://www.rusmedserv.com/radiology/biopsies/> Загл. с экрана

17.Методы гистологического исследования. [Электронный ресурс] - Режим
доступа: <http://biofile.ru/bio/19223.html> Загл. с экрана

18.Общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов.
[Электронный ресурс] - Режим доступа: [http://www.forens-
med.ru/book.php?id=524](http://www.forens-med.ru/book.php?id=524) Загл. с экрана

19.Приготовление гистологического препарата. [Электронный ресурс] -
Режим доступа: <https://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/histology/histology/r1/t1.html> Загл.
с экрана

20.Биопсийные исследования: Как делают биопсию? [Электронный ресурс] -
Режим доступа: <http://okeydoc.ru/biopsijnye-issledovaniya-kak-delayut-biopsiyu/>
Загл. с экрана

21.FISH – реакция. [Электронный ресурс] - Режим доступа:
<http://surgeryzone.net/onkologia/fish-reakciya.html> Загл. с экрана

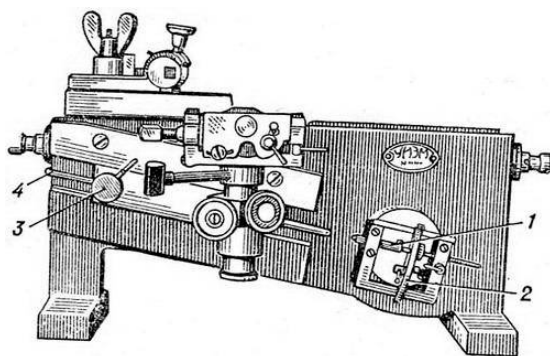
22.Общая гистология ткани [Электронный ресурс] - Режим доступа:
<http://biofile.ru/bio/19224.html> Загл. с экрана

Таблица 3 - Методы различных гистологических окрасок [15].

Окраска гематоксилин-эозином	1. а) Самый распространённый метод окраски. б) Сочетает основной и кислый красители. в) Поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие неклеточные структуры. 2. Ядра приобретают сине-фиолетовый цвет, цитоплазма - желтовато-розовый цвет. 3. Замечание: используемый гематоксилин готовится по методу Эрлиха: окисляется до гематеина калийными квасцами.
Окраска железным гематоксилином (по методу Генденгайна)	1. Препарат предварительно обрабатывают (протравляют) железноаммиачными квасцами, а потом обрабатывают гематоксилином. 2. Структуры приобретают коричневатого-серый цвет. 3. Хорошо выявляются структуры ядра, границы клеток, мышечные волокна.
Окраска по методу ван Гизона	а) Краситель - смесь растворов пикриновой кислоты и кислого фуксина. б) Коллагеновые волокна (содержащиеся в межклеточном веществе соединительной ткани) окрашиваются в ярко-красный цвет, а элементы других тканей (например мышечные волокна) в жёлтый цвет.
Окраска по методу Маллори	1. Краситель является трёхцветным: это смесь кислого фуксина, анилинового синего, оранжевого G, а также двух кислот. 2. а) Коллагеновые волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-синий цвет; б) многие другие структуры (ядра, мышечные волокна, эритроциты) в оранжевый или красный цвет.
Импрегнация серебром	1. а) Препарат обрабатывают аммиачным раствором серебра, а затем - восстановителями. б) В итоге, выделяющееся серебро осаждается на определённых волокнах соединительной ткани. – 2. Ретикулярные (аргирофильные) волокна приобретают чёрный цвет, коллагеновые волокна - коричневый, ядра клеток - светло-коричневый.
Окраска орсеином	Эластические волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-красный цвет, остальные структуры - в слабо-розовый цвет.
Окраска гематоксилин-пикрофуксином	Эластические волокна окрашиваются пикриновой кислотой в жёлтый цвет, коллагеновые волокна в красный цвет, ядра клеток - окрашиваются гематоксилином в тёмно-фиолетовый цвет.

Окраска по методу Шморля	1. Используется для окраски костей и дентина. 2. а) Предварительно кусочки материала подвергают декальцинации (с помощью кислоты), а затем выдерживают в растворе алюмокалиевых квасцов. б) Краситель - раствор тионина. 3. а) Стенки костных полостей и канальцев (выстланные сетью коллагеновых волокон) окрашиваются в тёмно-коричневый цвет; б) остальной фон - светло-коричневый.
Окраска азур 2 – эозином	Базофильные элементы окрашиваются азуром 2 в тёмно-синий, а оксифильные - в светло-красный цвет.
Окраска мазков по методу Романовского	1. а) Краситель - тот же, что и в предыдущем случае (азур 2 – эозин). б) Отличия же от приготовления срезов таковы: фиксацию мазков проводят чистым метанолом, окрашивание продолжают всего 30-45 мин, а не 12-14 ч, для заключения под покровное стекло используют кедровое масло, а не канадский бальзам. 2. Эритроциты приобретают бледно-красный цвет, цитоплазма лейкоцитов - голубой или синий цвет, цитоплазматические гранулы окрашиваются в зависимости от их природы.
Импregnация нитратом серебра	Особенности предварительной обработки препарата: • Фиксацию материала в формалине проводят не менее 7 дней. • Уплотнение образца осуществляют не путём заливки в парафин (или целлюлозу), а путём замораживания. • Срез готовят на специальном замораживающем микротоме. 2. При окрашивании срез последовательно обрабатывают растворами азотнокислого серебра, формалина и аммиачного серебра. 3. а) Элементы нервной системы (волокна, клетки и т.д.) окрашиваются в чёрный цвет, б) окружающие ткани - в светло-коричневый цвет.
Окраска толуидиновым синим по методу Ниссля	1. Толуидиновый синий окрашивает умеренно базофильные соединения в синий цвет. 2. С его помощью в цитоплазме нервных клеток обнаруживаются глыбки базофильного вещества (т.н. субстанция Ниссля).
Окраска метиловым зелёным-пиронином по методу Браше	1. Метод служит для выявления РНК. 2. а) Как и предыдущий метод, относится к гистохимическим методам исследования. б) Поэтому подробнее описывается ниже.

Микротом санный и замораживающий[14].



- 1 микрометрический винт;
- 2 перекидной механизм подачи;
- 3 винт, фиксирующий стержень основания объектодержателя;
- 4 стержень основания объектодержателя.

Рисунок 4- Санный микротом.

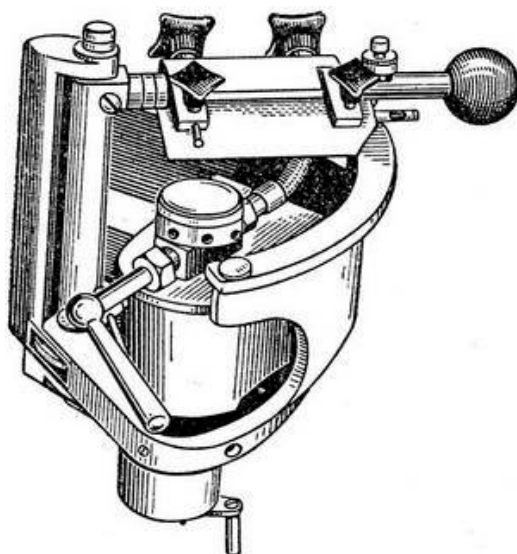


Рисунок 5- Замораживающий микротом.

Современное техническое оборудование патологоанатомического отделения.

1. Гистологический автомат Micro SCIENTIFIC Microm STP 120.



2. Автоматизированный гистопроцессор TERMO SCIENIFIC EXCELSIOR AS



Эти гистопроцессоры сочетают в себе возможность пользовательского программирования с простым использованием реактивов и управлением. Обработка образцов не требует постоянного контроля, как ночью, так и в течение рабочего дня. Ход выполнения программы можно проследить на экране монитора.

3. Заливочная станция (в парафин) Thermo SCIENTIFIC EC- 350.



Эта станция для заливки обеспечивает быстрое изготовление высококачественных парафиновых блоков, что в свою очередь облегчает изготовление качественного информативного среза, свободного от артефактов.

Станция для заливки EC350 включает два модуля: комбинированный модуль подогрева и дозирования парафина и модуль охлаждения. EC350 обеспечивает цепочку безошибочного перенесения проведенных образцов в парафиновый блок, исключая путаницу в нумерации. Объем бака для парафина на 5 л.

4. Ротационный микротом MICROM HM 325



Он оснащен системой переноса срезов (STS). Система состоит из специального держателя одноразовых ножей TE для STS со встроенной передающей дорожкой, подогреваемой водяной баней и блоком управления.

5. Автостейнер THERMO SCIENTIFIC GEMINI AS



Это многофункциональная система для окрашивания предметных стекол, предназначенная для легкого и эффективного окрашивания большого количества предметных стекол для микроскопа. Оснащенная сенсорным экраном с интерфейсом пользователя, который используется для запуска процессов окрашивания, для обслуживания протоколов и наборов протоколов, а также для задания системных предпочтений и настроек прибора.

6. Роботизированная система прибор TERMO SCIENTUFIC CLEAR VUE



Эта система делает просветление срезов и заключает их в среду, в которой они могут сохраниться длительное время.

7. Криостат TERMO SCIENTUFIC CRYO STAR HX 70

Этот аппарат для Cito-исследований.

