

Федеральное Государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Красноярский государственный  
медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-  
Ясенецкого»

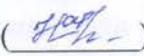
Министерства здравоохранения Российской Федерации

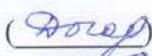
Фармацевтический колледж

## ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

**Тема:** Гистохимические методы исследования в современной  
лаборатории

по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

**Выполнил:** Пичуева Наталья Сергеевна (  )

**Руководитель:** Догадаева Елена Григорьевна (  )

**Рецензент:** Соколов Владимир Дмитриевич (  )  
зав. ОМО КГБУЗ ККПАБ

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

Протокол № 9 от «18» 2018 г.

Красноярск 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1.ТЕОРИТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ .	6
1.1 Этапы исследования гистологического препарата.....	6
1.2. Обезвоживание, уплотнение и заливка материала в парафин, изготовление срезов.....	7
1.3. Предварительная подготовка срезов к окрашиванию.....	10
1.4. Красители и их приготовление.....	13
1.5.Важнейшие методы гистохимического исследования.....	14
ГЛАВА 2.САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ ПРОВЕДЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ .....	22
2.1. Гистохимические методы в современной лаборатории.....	22
2.2. Результат учета исследований выполненных объёмов в КГБУЗ «ККПАБ» .....	28
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	31
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	32
ПРИЛОЖЕНИЕ А (Микротом ротационный и санный) .....	34
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (Современное техническое оборудование в патолого – анатомическом отделении).....	35
ПРИЛОЖЕНИЕ В (Объемы выполненных исследований за 2015 – 2017 год)..	36

## ВВЕДЕНИЕ

Гистохимия – это раздел гистологии, изучающий локализацию различных химических веществ и продуктов их метаболизма в тканях. Некоторые методы окрашивания позволяют выявлять в клетках те или иные химические вещества. Возможно дифференциальное окрашивание жиров, гликогена, нуклеиновых кислот, нуклеопротеинов, определенных ферментов и других химических компонентов клетки.

В настоящее время нельзя найти ни одно направление биологии, где гистохимический анализ не был бы использован. Это в равной степени относится к изучению принципов физико-химической организации клеток и тканей, к изучению вопросов регуляции. Гистохимия, как научное направление, оформилось в середине XIX века и ее основателем считается французский фармацевт, ботаник и микроскопист Франсуа Винсент Распайль. Он опубликовал свои первые работы по ботанической гистохимии в 20-30х годах XIX-го века, первое ясное понимание и правильная оценка микроскопической химии тканей как науки принадлежит работам Ф.В.Распайля, выполненных в 1825-1829 годах. Изучая процесс оплодотворения у Graminaceae (злаковые), Ф.В.Распайль использовал йодную реакцию на крахмал. В 1829 году он впервые применил ксантопротеиновую реакцию на белки, ему приписывается открытие микросжигания для изучения неорганических соединений в тканях, он был первым исследователем, который занимался определением рН протоплазмы с использованием индикаторных красителей (лакмус).

Гистохимия и цитохимия развиваются на стыке различных наук и, прежде всего, на стыке гисто - и цитологии, биохимии, аналитической химии и клеточной биофизики. Кроме этого, необходимо отметить, что развитие и совершенствование гистохимии связано с развитием химии красителей, разработкой оптических и оптико-электронных приборов (микроскопы и анализаторы изображений), развитием теоретической и прикладной оптики

(микротофотометрия) и ряда биологических наук — иммунологии, клеточной инженерии, молекулярной биологии. Возникло новое направление гистохимии - иммуногистохимия, позволяющая решить многие вопросы клеточного иммунитета и цитохимии иммуно-компетентных клеток. Большое внимание уделяет современная гистохимия изучению химической организации и метаболизму нервной ткани.

**Актуальность:** С помощью разнообразных методов современной гистохимии можно судить об особенностях функционирования различных тканевых и клеточных структур, определять характер и темп обменных процессов в клетках и тканях, обнаруживать ранние проявления заболеваний.

**Объект исследования:** Ткани и органы живого и мертвого человека.

**Предмет исследования:** Витамины, липиды, нуклеиновые кислоты, углеводы (гликоген), белки (амилоид, ферменты), соли кальция и металлов и др.

**Цель:** изучение гистохимических методов исследования в современной лаборатории.

**Задачи:**

1. Изучить теоретические основы гистохимических методов исследования.
2. Провести основные гистохимические методы исследования в лаборатории.
3. Исследовать статистику проведения гистохимических исследований за 3 года по заболеваниям.

**База:** КГБУЗ «Красноярское краевое патолого - анатомическое бюро» ПАО №1.

**Методы исследования:** изучение научно-исследовательской, судебно-медицинской литературы, нормативно-правовой документации, гистологических исследований, а также статистическая обработка результатов. Материалом для написания дипломной работы послужила учебная литература, изучение статей и работ авторов, В.К. Анреп, В.Л. Быкова, М.И. Касьянова, С.Л. Кузнецова и других ,а так же электронные ресурсы и статьи.

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, виды гистохимических методов. Вторая глава представлена практической частью, в которой содержатся план проведения основных современных методов, 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. ТЕОРИТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

## 1.1 Этапы исследования гистологического препарата

### Техника вырезки материала

Оптимальная площадь кусочков ткани 2 — 3 см<sup>2</sup>, толщина до 5мм. Вырезанные кусочки ткани непосредственно с лезвия ножа погружают в фиксатор. Недопустимы сдавливание кусочков, промывание их водой, а также очистка поверхности органа, особенно слизистой оболочки, инструментами, пальцами и т.д. После погружения кусочков в сосуд с фиксатором туда же опускают этикетку с номером (шифром, маркировкой), написанным карандашом или тушью на матовой поверхности фотобумаги. В тех случаях, когда возникает необходимость маркировки каждого кусочка, его вместе с этикеткой завязывают в марлевый мешочек или помещают кусочки в кассету для проводки материала.

### Общие принципы фиксации

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов. Слишком продолжительная фиксация (более 48 часов) приводит к значительному уплотнению материала, что в дальнейшем затрудняет его обработку. Для фиксации лучше использовать емкости с широким горлом, чтобы не возникло проблем с извлечением фиксированного материала. Материал фиксируют при комнатной температуре (+18 - 22гр. С), но для некоторых видов исследования (гистохимических, электронно-микроскопических и др.) необходимо проводить фиксацию при более низкой температуре + 4 °С.

Возможные артефакты, связанные с фиксацией,

и их устранение

При фиксации формалином, особенно кислым, возможно появление в срезах темно-коричневого пигмента в виде зернышек или включений (результат реакции формалина с гемоглобином ткани). Пигмент удаляют, помещая срезы

на 15-20 мин в 1-5 % раствор аммиака или 70 % спирт. После промывания водой препарат можно окрашивать.

## 1.2. Обезвоживание, уплотнение и заливка материала в парафин, изготовление срезов

Алгоритм:

1 этап — обезвоживание:

- промытый материал поместить в 50% спирт на 1-3 часа
- перенести в 70% спирт на 3-6 часов
- перенести в 96% спирт 1 порция на 3-6 часов
- перенести в 96% спирт 2 порция на 3-6 часов
- поместить в 100% спирт на 3-6 часов

2 этап — уплотнение:

- материал поместить для пропитывания в ксилол (1-я порция) по 1-3 часа
- перенести во 2-ю порцию ксилола на 1-3 часа
- поместить материал в смесь ксилола с парафином (каша) в соотношении 1:1 в термостате при 37 градусах на 3-6 часов
- пропитать материал в парафине (1-я порция) в термостате при 56 градусах на 1,5-2 часа
- перенести материал во 2-ю порцию парафина в термостат при 56 градусах на 1,5-2 часа

3 этап — заливка в парафин (вариант 1):

- приготовить бумажные формочки для заливки материала или использовать для заливки чашки Петре, кассеты;
- емкость с парафином (2-я порция) перенести на водяную баню;
- теплым пинцетом перенести материал в центр бумажной формочки;
- аккуратно заполнить формочку парафином ;
- формочки до краев погрузить в холодную воду (охлаждают), пока на поверхности не появится пленка

- ждем полного затвердения парафина.

3 этап — заливка в парафин (вариант 2):

Заливка материала с использованием модульной системы для заливки в парафин.

Алгоритм:

- выбрать заливочную форму в зависимости от размера кусочка;
- налить расплавленный парафин в заливочную форму (если в лаборатории нет возможности использовать для заливки готовую гомогенизированную парафиновую среду (например, Histomix), которая уже содержит в своем составе парафин, натуральный воск и синтетические полимерные добавки, то к порции парафина следует добавить пять процентов воска.
- перенести материал из кассеты в заливочную форму;
- накрыть заливочную форму крышкой от кассеты;
- завершить заливку материала через отверстия кассеты;
- поместить блок на поверхность охлаждающего модуля;
- отделить кассету с блоком от заливочной формы;
- образец готов к микротомии, т.е. можем резать на микротоме.

#### Изготовление срезов и их наклейка

Для изготовления срезов из парафиновых блоков обычно используются два типа микротомов – санные и ротационные. Микротом — это устройство для изготовления тонких гистологических срезов тканей животных и растений. Саный микротом состоит из: станины, «салазок», микровинта, подвижного столика, в котором закреплен объект и микротомного ножа. В некоторых микротомегах столик с объектом каждый раз поднимается на заданную высоту, равную толщине среза, а нож перемещается в горизонтальной плоскости, рассекая ткань. Иногда нож укреплен неподвижно, а перемещается по вертикали столик с объектом, каждый раз надвигаясь на лезвие ножа.

Санные микротомы используют для получения срезов тканей предварительно заключенных в парафин или целлоидин.

Для получения срезов нефиксированной ткани, а также в случаях, когда необходимо изучить объект в короткий промежуток времени, используют замораживающие микротомы, снабженные замораживающим столиком, на котором укрепляется исследуемый объект. Столик с гибким шлангом соединен с металлическим баллоном, в котором находится жидкая углекислота. Ротационный микротом - имеет неподвижный нож, горизонтально закрепленный лезвием вверх. Держатель объекта передвигается вверх и вниз путем вращения колеса рукой или электромотором. Специальный механизм выдвигает держатель объекта при каждом его поднятии на заданное количество микронов. Срезы один за другим сползают с ножа на специальную ленту, движущуюся синхронно с держателем. Этот тип микротома особенно удобен для получения серийных срезов с залитого в парафин материала.

В процессе изготовления следует снимать срезы с микротомного ножа при помощи кисточки и препаровальной иглы таким образом, чтобы не коснуться режущей кромки ножа. Срезы с ножа обычно собирают в 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, 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. После расправления срезов на стекле излишек воды (вокруг срезов) аккуратно удаляют фильтровальной бумагой. Это желательно сделать, если необходимо провести окраску срезов в день их изготовления. Затем лотки с предметными стеклами и срезами помещают в термостат (+37 °С) на ночь. После этого срезы могут быть окрашены. Достаточно тонкие срезы (4 мкм) будут готовы к окраске уже через 2 – 3 ч после помещения в термостат при 37 °С.

## Подготовка предметных стекол

Виды стекол. Перед наклеиванием предметные стекла должны быть подготовлены для того, чтобы в ходе дальнейшей обработки срезы не отклеивались. Подготовка предметных стекол к работе состоит из двух этапов – очистки (обезжиривания) и нанесения адгезивного покрытия.

### 1.3. Предварительная подготовка срезов к окрашиванию.

#### Депарафинирование срезов

Парафиновые или целлоидин - парафиновые срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя — толуола, ксилола. Депарафинирование осуществляют по следующей схеме:

Таблица 1 – Схема последовательности депарафинирования срезов

Ксилол I	10-15 мин (можно в термостате при 37 °С)
Ксилол II	3 — 5 мин
Спирт 100 % I	1-2 мин
Спирт 100 % II	ополоснуть
Спирт 96 % I	ополоснуть
Спирт 96% II	ополоснуть
Дистиллированная вода	2 смены

Депарафинированные препараты готовы к окрашиванию сразу же после промывания в дистиллированной воде, но во избежание отклеивания срезов, особенно при окраске по Ван-Гизону, их лучше подсушить на воздухе. Если окрашивание производят не сразу, то депарафинированные и высушенные

препараты аккуратно, чтобы не повредить срезы, складывают на планшеты и окрашивают по мере необходимости.

### 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. 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. 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. Для хранения красителей и проведения окраски применяют химически чистую маркированную посуду. После приготовления новых порций красителя, особенно при использовании различных партий реактивов окраску нужно контролировать под микроскопом. Продолжительность окрашивания реактивами различных фирм варьирует.

#### Замечания по технике окрашивания

При окраске водными красителями срезы переносят в краситель из дистиллированной воды, а при окраске спиртовыми — из соответствующего раствора спирта. После того как препарат приобретает интенсивную окраску, его промывают в воде или спирте для удаления избытка красителя (дифференцировка), контролируя этот процесс под микроскопом. Срезы тканей после целлоидиновой проводки, а также полученные на замораживающем микротоме окрашивают в широкогорлых бюксах или на часовых стеклах. Одновременно окрашивают несколько срезов, но 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.

#### 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).

#### 1.4. Красители и их приготовление.

##### Ядерные красители

В практической работе чаще используют протравные красители. К ним относятся гематоксилин, кармин, сафранин, галлоцианин, ализарин. Хорошо окрашивают ядра такие красители, как основной коричневый, тианин, метиленовый синий, основной фуксин, метиловый зеленый и др.

##### Гематоксилины и способы их приготовления

Гематоксилин имеет растительное происхождение: его получают из эфирного экстракта кампешевого дерева. Гематоксилин хорошо растворяется в спирте и плохо в воде. Красящими свойствами обладает продукт окисления гематоксилина — гематеин, поэтому краситель становится пригодным только после созревания — окисления, на которое требуется от 10 дней до 2 — 3 нед. Созревание можно ускорить с помощью солей алюминия, хрома, железа и др.

А) Гематоксилин Эрлиха - гематоксилин растворяют в спирте, а квасцы — в дистиллированной воде, смешивают оба раствора и затем добавляют остальные компоненты. Раствор периодически перемешивают. Через 10-14 дней он приобретает темно-вишневый цвет, что свидетельствует о готовности красителя. Продолжительность окрашивания гематоксилином Эрлиха 4 — 6 мин. Результат: ядра клеток (оболочка, хроматин) темно-синие, ядерный матрикс бледно-голубой или прозрачный.

Б) Гематоксилин Гарриса- смешивают растворы I и II, затем добавляют 60 мл глицерина и 2,5г оксида ртути (красной или желтой). Раствор нагревают до 100 °С, остужают, фильтруют. Перед использованием к 100 мл раствора добавляют

2 мл ледяной уксусной кислоты. Преимуществами гематоксилина Гарриса являются быстрота приготовления и четкость окраски ядер. Продолжительность окрашивания 3 — 4 мин. Результат: ядра ярко-синие.

В) Гематоксилин Маллори (водный) - раствор выдерживают 10 суток при 25 °С, добавляют 440 мг перманганата калия и 2,5г тимола. Перемешивают несколько раз, перед окрашиванием фильтруют. Продолжительность окрашивания 3 — 4 мин. Затем следуют те же процедуры, что и при окрашивании гематоксилином других модификаций. Результат: ядра синие

### Цитоплазматические красители

Окрашивание цитоплазмы клеток происходит в результате связывания оснований и белков кислотными красителями. В группу диффузных (кислых) красителей входят карбоновые и сульфоновые кислоты, нитро - азокрасители и др. В гистологической практике постоянно применяют эозины, пикриновую кислоту, оранжевый Г, кислый фуксин, конго - красный (конгорот), азокармин, эритрозин. Чаще используют 1 % водные растворы этих красителей, но можно применять и 1 % спиртовой раствор. Продолжительность окрашивания колеблется от 5 с до 3-5 мин в зависимости от сорта и серии красителя. Если препарат перекрашивается, то излишек краски легко удаляется при ополаскивании в дистиллированной воде и последующем обезвоживании препарата или среза в спиртах.

## 1.5.Важнейшие методы гистохимического исследования.

### Принципы гистохимических реакций

В основе большинства гистохимических реакций лежат общие принципы:

1. Определенные химические группировки окрашиваются тем или иным красителем. Например, фосфатные группы РНК образуют с основными красителями (пиронин, толуидиновый синий и др.) солеобразные окрашенные соединения.

2. Краситель растворяется в определенном субстрате, входящем в состав клеточных структур. Например, окраска жировых включений в клетке основана на растворении судана в жировой капле.

3. Некоторые химические компоненты клеток, такие, как ДНК, полисахариды, неспособны реагировать с красителями. В таких случаях прибегают к превращению их химических группировок в реакционно-активное состояние (гидролиз ДНК хлористоводородной кислотой, окисление полисахаридов йодной кислотой). При этом освобождаются или создаются вновь химические группировки, которые способны реагировать с соответствующими реактивами, в результате чего образуется окрашенный продукт реакции.

4. При выявлении локализации некоторых компонентов клетки прибегают к многоступенчатым промежуточным реакциям и переводу неокрашенного продукта реакции в окрашенный. Например, так поступают при гистохимическом исследовании в тканях ферментов.

#### Окрашивание жиров и жироподобных веществ (липидов)

Определение жиров и жироподобных веществ относится к числу весьма распространенных методов исследования. Липиды приходится выявлять не только при изучение жировых дистрофий, но и при различных воспалительных и новообразовательных процессах, когда обнаружение их может приобретать большое диагностическое значение, как например, при установление ксантом, различных форм ретикулезов и т.д. В организме человека, кроме жира, встречаются самые разнообразные жироподобные вещества: холестерин, цереброзиды, фосфатиды и прочее. Для обнаружения их предложены многочисленные красители (суданIII и IV, судан черный «В», шарлах красный, жировой красный, хлорофил, сульфат нильский голубой, осмиевая кислота. Однако в практике рядов патологогистологических лабораторий из всего ряда перечисленных средств повседневное применение имеют лишь

немногие, а именно: судан III и IV, шарлах красный, сульфат нильский голубой. Судан III и IV и шарлах красный позволяют определить все жиры и жироподобные вещества, но окрашивают их с неодинаковой интенсивностью. Так, наиболее интенсивно окрашиваются нейтральные жиры – в ярко – красный цвет, фосфатиды и цереобразны – в бледно – желтый. Впрочем, различия в окраске имеют весьма относительное диагностическое значение, поскольку жиры и жироподобные вещества часто встречаются в смешанном виде. Кроме того интенсивность окрашивания может быть связана с длительностью хранения материала в формалине, и с продолжительностью самого процесса окрашивания. Липиды, почти как правило, исследуют на замороженных срезах, полученных из объектов, фиксированных в формалине. Длительность хранения объектов в формалине ведет к неудовлетворительной окраске судановыми красителями и делает совершенно невозможным дифференцирование окрашивание сульфатом нильским голубым.

А) Судан III, судан IV. Это анилиновые азокрасители, не растворимые в воде, но растворимые в спирте, ацетоне и лучше всего в липидах. Суданы 3 и 4 в спиртовых растворах широко используются для обнаружения жиров и жироподобных веществ. Судан 4 более сильный краситель по сравнению с суданом 3 и в настоящее время вытесняет его. Помимо указанных суданов есть еще суданы 1 и 2, которые обладают такими же свойствами, что и первые два, но окрашивают липиды слабее и поэтому почти не употребляются.

Б) Шарлах красный. Весьма сходен с красными суданами и тоже представляет собой нейтральную анилиновую азокраску. Из него готовят точно такие же красящиеся растворы, как из суданов 3 и 4. Употребляют наравне с последними и окрашивают по одинаковой с ними методике. Некоторые исследователи отдают предпочтение шарлаху красному перед суданом III.

В) Судан черный. Особенно хорош для обнаружения фосфолипидов, поэтому надо иметь в виду, что если исключено наличие нейтральных жиров, то их всех других липидов он обычно выявляет фосфолипиды. Все красящиеся растворы

суданов (красных и черного) и шарлаха красного перед употреблением обязательно фильтруют. Для фильтрования употребляют только рыхлые быстро фильтрующие сорта бумаги.

Г) Окраска по Гольдману. Этот метод, предложенный в 1929г., дает окрашивание липидной зернистости в лейкоцитах и заменяет реакцию на оксидазу. Одновременно окрашиваются жировые включения и в других клеточных элементах. Способ хорош для изучения содержания и распределения лейкоцитов в тканях.

### Окраска на слизь

Окраска на слизь имеет большое диагностическое значение при некоторых патологических процессах. В частности, диагностика такого патолого - анатомического состояния слизистой оболочки матки, как аденоканкроид, когда из железистого эпителия ее в порядке метаплазии образуется плоский многослойный, основана на положительной реакции на слизь, которую дает этот новообразованный плоский эпителий. Такой положительной реакцией на слизь он выявляет своей аденогенное происхождение и этим отличается от плоского многослойного эпителия шейки матки. Существует много способов окраски на слизь. Наиболее распространены три метода: окраска муцикармином Мейера, окраска по Гойеру и альциановым синим. В патолого - анатомическом отделении чаще всего пользуются метод Мейера и окраска альциановым синим.

А) Альциановый синий. Эту методику впервые предложил Steedman в 1950 г. как специфический краситель на муцин. Это наиболее простой и надежный метод для определения слизи эпителиальной ткани. Лучшая фиксация по Steedman, жидкости Ценкера, Суза и Буэна, но очень хорошие результаты дает и фиксация в 10 – 15% формалине. Наиболее пригодны парафиновые срезы.

Б) Окраска гликогена по методу Беста. Так как гликоген быстро исчезает из клеток после смерти (в связи с растворением его в тканевых жидкостях),

кусочки для исследования надо брать как можно скорее, толщина их не должна превышать 0,2 см. Материал, предназначенный для исследования на гликоген, фиксируют обычно в крепких спиртовых растворах, так как гликоген в них не растворим. Наиболее употребительны следующие фиксаторы: абсолютный спирт, жидкость Карнуа, смесь крепкого спирта с формалином. Кусочки лучше всего заливать в целлоидин, так как в нем гликоген утрачивает свою способность растворяться в воде. Можно заливать в парафин, но при обычных условиях работы с парафином, когда на отдельных этапах обработки имеет место контакта срезов с водой, возможны некоторые потери гликогена. Чтобы избежать таких потерь, парафиновые срезы наклеивают либо сухим способом, либо влажным, но с применением вместо теплой воды подогретого крепкого спирта.

В) Окраска гликогена по Шабадашу. Это один из чувствительных методов для обнаружения гликогена. Основана методика на окисление полисахаридов малыми дозами перйодатов калия или натрия с образованием свободных альдегидных групп, которые дают с фуксинсернистой кислотой соединение вишневого цвета. Гликоген в тканях окрашивается в красно-бардовый цвет.

#### Окраска на амилоид

Для выявления амилоида существует целый ряд специальных методов, из которых наиболее распространенными являются: окраска генциановым фиолетовым, метиловым фиолетовым и окраска красным конго.

А) Окраска генциановым фиолетовым или метиловым фиолетовым. Это очень демонстративная окраска, основанная на метахромазии. Фиксация материала в формалине или в спирте. Окраску можно производить как на замороженных, так и парафиновых срезах. В том случае, когда нужно получить замороженные срезы из материала, фиксированного в спирте, кусочки предварительно промывают в проточной воде в течение нескольких часов.

Б) Окраска красным конго. Окраска хорошо удаётся как после спиртовой, так и формалиновой порции и на любых срезах. Парафиновые срезы предварительно должны быть освобождены от парафина. Окрашенные препараты можно включать в бальзам, в котором они хорошо сохраняются. Очень хорошие результаты получаются, если срез вначале окрасить каким-либо квасцовым гематоксилином и уже после красным конго.

#### Выявление соединений железа

Есть несколько классических способов выявления железа, из которых в ПАО применяют два, а именно: метод Перлса на берлинскую лазурь, (этот метод чаще применяется), и метод Тирмана – Шмельцера на турнбулеву синь. Материал, подлежащий исследованию на железо, должен быть обязательно свежим. Для фиксации употребляют как крепкие спирты (95% или абсолютный), так и 10% нейтральный формалин. Последний по мнению некоторых исследователей, даже лучше, чем спирт. Однако, применяя формалин, не следует задерживать в нем объекты более 1-2 дней, после чего их быстро обрабатывают, т.е. либо режут на замораживающем микротоме, либо заливают в парафин.

Реакция на берлинскую лазурь(по Перлсу). Самая доступная и в то же время высокочувствительная реакция для выявления железа, содержащегося в гемосидерине и других соединениях, в которых железо связано с белком.

#### Выявление извести (солей кальция)

Известковые соли в тканях обычно встречаются в форме углекислого и фосфорнокислого кальция. На неокрашенных препаратах отложения извести представляются в виде темных или светлых глыбок, и зерен, которые растворяются при прибавлении 5-10% раствора соляной кислоты. Квасцовые гематоксилины интенсивно окрашивают в темно-синий цвет места отложения извести и потому последние легко определяются уже при простых способах окраски.

Выявление извести по Косса. Этот метод позволяет выявлять прежде всего отложения фосфорнокислой извести. Кусочки рекомендуется фиксировать в крепком спирте, так как при фиксации в хромовых смесях и в формалине небольшие отложения извести могут извлекаться из тканей.

### Современные методы исследования биопсийного (операционного) и аутопсийного материала

Современные методы исследования дают возможность не только изучать ткани как одно целое, но и извлекать из них отдельные виды клеток для исследования их жизнедеятельности в течение длительного количества времени, выделять отдельные клеточные органеллы и составляющие их макро (микро) молекулы, такие как ДНК, и исследовать их морфо - функциональные особенности.

Световая микроскопия - основной метод анализа строения тканей. Современные микроскопы обеспечивают разрешение порядка 0,2 мкм и дают максимальное увеличение в 2000 – 5000 раз.

Фазово-контрастная микроскопия - используется для изучения прозрачных бесцветных объектов, например живых клеток и тканей. При прохождении через такую среду фаза световой волны смещается на величину, которая определяется толщиной материала и скоростью проходящего через него светового луча.

Флуоресцентная микроскопия - при данном исследовании препарат просматривают в ультрафиолетовых лучах. Различают собственную и наведённую флуоресценцию, вызванную особыми красителями – флуорохромами, которые, взаимодействуя с различными компонентами клетки, дают специфическое свечение соответствующих структур. Так, например, флуорохром акридиновый оранжевый с ДНК дает зеленое свечение, а с РНК – красное. Основное преимущество данного метода это возможность прижизненных наблюдений и его высокая чувствительная способностью

Ультрафиолетовая микроскопия – основана на использовании коротких ультрафиолетовых пучков с длиной волны 0,2 - 0,4 мкм. Изображение регистрируется на фотопластинке или на люминесцентном экране.

Электронная микроскопия – метод микроскопического исследования, который осуществляется с помощью трансмиссивного электронного микроскопа. В таком микроскопе длина электромагнитной волны примерно в 100 000 раз короче волны видимого пучка света. Метод сканирующей электронной микроскопии обеспечивает объемное исследование поверхностного объекта.

Авторадиография - метод цитологического исследования, который позволяет проанализировать локализацию в клетке веществ, меченных радиоактивными изотопами. Включенные в клетку изотопы восстанавливают бромистое серебро фотоэмульсии видны зерна серебра, так называемые треки, которые свидетельствуют о локализации в клетке меченных веществ. Методом авторадиографии выявляют место синтеза и локализацию определенных веществ, пути их внутриклеточной транспортировки, состав белков и прочее. Наиболее современным является именно этот метод.

## ГЛАВА 2. САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ ПРОВЕДЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

### 2.1. Гистохимические методы в современной лаборатории

Практическая часть исследования выполнена на базе КГБУЗ «Красноярское краевое патолого - анатомическое бюро», в патолого - анатомическом отделении №1.

Я присутствовала на 8 вырезках, из которых 3 проводила самостоятельно. Всего мною было сделано 25 гистологических препаратов.

Материалом для исследования послужили: вырезка операционного, биопсийного и аутопсийного материала.

При исследовании мной использовались повседневные, банальные методики окраски и современные гистохимические методы:

#### **Вид окраски: Окраска гематоксилином и эозином.**

Окраска гематоксилин - эозином — наиболее распространённый метод окрашивания срезов. Этот метод позволяет установить отношения между частями органа, отлично выявляя все клеточные элементы и некоторые неклеточные структуры. Практически во всех случаях независимо от поставленной задачи применяется окраска гематоксилин - эозином. В большинстве случаев для изучения структуры нормального или измененного в результате болезни органа ограничиваются этим методом окраски. В других случаях, когда перед исследователем стоит специальная задача, пользуются особыми методами, окрашивая в то же время параллельно ряд срезов гематоксилин - эозином. Эта окраска является двойной: гематоксилин — основной краситель — окрашивает ядра клеток, эозин — кислый краситель — красит протоплазму клеток и в меньшей степени — различные неклеточные структуры.

Таблица 2 - Порядок проведения окраски

Дистиллированная вода	ополоснуть
Раствор гематоксилина	1-20 мин
Солянокислый спирт	дифференцировка
Аммиачная вода	срезы синеют (контроль под микроскопом)
Проточная вода	5-10 мин
Дистиллированная вода	ополоснуть
Раствор эозина	10с-3 мин
Спирт 96%, карбол - ксилол, заключение	

### **Окраска пикрофуксином по Ван - Гизону.**

Окраска соединительной и мышечной тканей гематоксилин-пикрофуксином по методу Ван — Гизона широко используется в гистологической практике, как для получения обзорных препаратов, так и для некоторых специальных целей. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с окраской гематоксилин - эозином, так как по-разному окрашивает различные ткани. Так, соединительная ткань после окраски пикрофуксином имеет ярко-красный цвет, а все остальные ткани — буровато-желтый или желто-зеленый. Метод Ван - Гизона позволяет отдифференцировать гладкомышечные клетки от соединительнотканых в тех случаях, когда их трудно различить на препаратах, окрашенных другими методами. В качестве

ядерной окраски применяется железный гематоксилин Вейгерта, дающий черную или буро-черную окраску ядер.

**АЛГОРИТМ:**

- Удаление парафина из срезов в ксилоле и проведение среза через спирты нисходящей крепости до 80 % этанола (возможный вариант обработки: орто - ксилол — 2 порции по 3-5 минут, 96 % этанол — 3 мин, 90 % этанол — 3 мин, 80 % этанол — 3 мин).
- Окраска железным гематоксилином Вейгерта в течение 3-15 минут.
- Промывание в проточной воде в течение нескольких минут.
- Промывание дистиллированной водой.
- Окраска красителем Ван - Гизона в течение 5 минут.
- Быстрая промывка в дистиллированной воде (5–15 с).
- Быстрая промывка в двух порциях 96 % этанола, одной порции абсолютного этанола (или карбол - ксилола), просветлить в двух порциях орто-ксилола. Время пребывания срезов в каждой порции 1-2 мин.
- Закрепление препарата нейтральным бальзамом.

**Комбинированная окраска на креатинин и слизь по Крейбергу.**

Фиксированный в 10 % растворе формалина материал заливают в целлоидин или парафин. Для окрашивания готовят альциановый синий, сафранин и эритрозин.

1. Альциановый синий: 50 мл 1 % водного раствора альцианового синего + 50 мл 1 % раствора уксусной кислоты + 10 мг тимола.

2. Сафранин: 5 г сафранина смешивают в термостойкой посуде со 100 мл 100 % спирта, затем кипятят на водяной бане 1 ч.

Полученный раствор сливают в бутылку и к осадку добавляют еще 100 мл 100 % спирта. Вновь кипятят, повторяя эту процедуру не менее 5 раз. Полученный экстракт (700 мл раствора позволяют окрасить 1000 срезов) фильтруют и хранят в тщательно закрытой посуде.

3.Эритрозин: на водяной бане готовят 1 % водный раствор эритрозина, затем фильтруют и добавляют 10 мг тимола.

Методика окраски

1. Депарафинированные срезы ополаскивают в дистиллированной воде.
2. Ядра окрашивают любым гематоксилином без длительной дифференцировки.
3. Очень быстро дифференцируют в 0,5 % растворе соляной кислоты.
4. Тщательно просушивают фильтровальной бумагой.
5. Переносят в раствор эритрозина на 5 мин.
6. Очень быстро ополаскивают в дистиллированной воде, 96 % спирте, дистиллированной воде.
7. Переносят в раствор альцианового синего на 3 — 5 мин.
8. Быстро обезвоживают в 96 % спирте.
9. Погружают в раствор сафранина — 5 мин.
10. Ополаскивают в 2 сменах 100 % спирта.
11. Просветляют и заключают по любой методике.

Результат: ядра клеток темно-синие, кислые гликозаминогликаны голубые, клетки красные, прочие ткани розовые и фиолетовые.

### **Окраска хеликобактерий по методу Романовского - Гимза.**

Метод окраски микропрепаратов по Романовскому - Гимзе - это один из самых популярных методов окрашивания бактерий, простейших, а так же клеточных структур и тканей самых различной структуры. Данный метод используется в том числе и для исследований крови посредством световой оптической микроскопии. Посредством данного метода окраске подлежат ацидофильные образования в разные оттенки красного цвета. Образования базофильного характера окрашиваются в цвет от пурпурного до синего.

Срезы тканей фиксируют — в смесях, содержащих хром. Непосредственно перед употреблением основной раствор краски разводят дистиллированной водой или буферным раствором. Степень разведения и показатель рН зависят от объекта исследования. Срезы тканей обычно

перекрашивают (до 24 час.) и затем дифференцируют в 96% этиловом спирте. После окраски срезы быстро обезвоживают и заключают в бальзам. В результате окраски хроматин ядер приобретает красно-фиолетовый, эозинофильные гранулы — красно-коричневый, нейтрофильные гранулы — фиолетовый, базофильные зерна — синий цвет. Цитоплазма моноцитов и лимфоцитов синяя, иногда с пурпурно-красной так называют азурофильной зернистостью, тромбоциты синие с пурпурно-красными грануломерами, эритроциты розовые, ядра паразитов крови ярко-красные. Результаты окраски могут варьировать в зависимости от рН среды.

### **Окраска амилоида красным конго - рот**

Присутствие свободной соляной кислоты в желудочном соке можно обнаружить с помощью индикаторов, меняющих свой цвет в зависимости от изменения реакции среды. Для обнаружения свободной соляной кислоты в желудочном соке используют обычно конго красный, имеющий в сильнокислой, среде синюю окраску, а в нейтральной и щелочной — красную, и диметиламино - азобензол, имеющий в щелочной среде желтую окраску, а в присутствии минеральных кислот — вишнево - красную.

Методика окраски: в три цилиндра поместить по 10 мл уксусной кислоты, 200 мл воды и 2 мл раствора конго красного. Растворы окрашены в синий цвет. В первый и второй цилиндры добавить по 50 мл насыщенного раствора ацетата натрия. Цвет раствора меняется из синего в розовый (изменение рН от 2,15 до 5,2) вследствие образования буферной смеси. Добавить в первый цилиндр 50 мл раствора хлористоводородной кислоты— цвет не меняется. Добавить во второй цилиндр 50 мл раствора гидроксида натрия — цвет также не меняется. Для сравнения добавить в третий цилиндр, где нет буферной смеси, 50 мл раствора гидроксида натрия. Синяя окраска резко переходит в розовую.

## Окрашивание липидов и липоидов (суданом III)

Окрашивание жира и липоидов очень часто применяется в гистологической и патологоанатомической практике. Различные методики окраски позволяют не только обнаружить жиры и жироподобные вещества в клетках и тканях, но и судить о характере этих веществ. Окрашивание суданом III - является наиболее распространенным методом выявления жира.

Приготовление раствора красителя: в 100 мл горячего 70% спирта засыпают 0,2-0,3 г порошка судана III, несколько раз взбалтывают и ставят в термостат (при 58°C) на несколько часов, затем охлаждают и фильтруют.

Методика:

1. Замороженные срезы (из свежей или фиксированной в формалине ткани) на несколько минут переносят из воды в 50% спирт.
2. Помещают в спиртовой раствор красителя на 15-30 мин (при применении щелочного раствора судана III — на 5 минут).
3. Быстро ополаскивают в 50% спирте.
4. Промывают в дистиллированной воде.
5. Подкрашивают ядра кислым гемалауном или гематоксилином Эрлиха.
6. Промывают и заключают в желатин или глицерин-желатин

Результат: жировые вещества интенсивно оранжево-красного цвета, ядра — синие.

Окраску срезов раствором Судана III следует проводить в бюксе с открытой крышкой. В противном случае спирт испаряется, и из насыщенного раствора судан III выпадает в виде осадка, который остается в препарате.

## 2.2. Результат учета исследований выполненных объёмов в КГБУЗ «ККПАБ»

Согласно данным организационно-методического отдела КГБУЗ «Красноярское краевое патолого - анатомическое бюро » за период 2015-2017 г.г., было обработано 402 183 случаев.

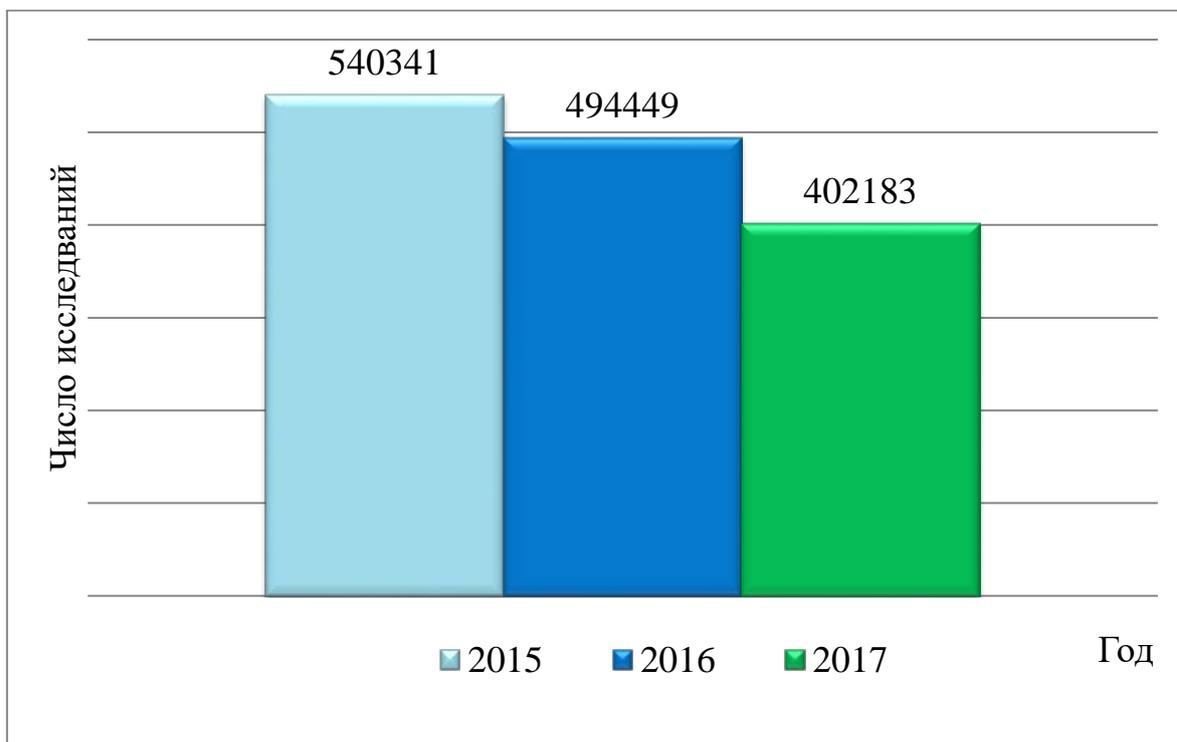


Рисунок 1 - Абсолютное число проведенных гистологических исследований в КГБУЗ «ККПАБ» за 2015 - 2017 год по Красноярскому Краю.

Количество исследований биопсийного (операционного) материала по КГБУЗ ККПАБ за период 2015 – 2017 постепенно снижается и это связано со снижением количества дополнительных окрасок (исследований) для операционного материала. Согласно приказа МЗ РФ №179-н от 24 марта 2016г. «О Правилах проведения патолого - анатомических исследований» с 2016 года объемы исследований в ПАО рассчитывают на случаи (пациентов), а не на исследования , как это было с 1981г.

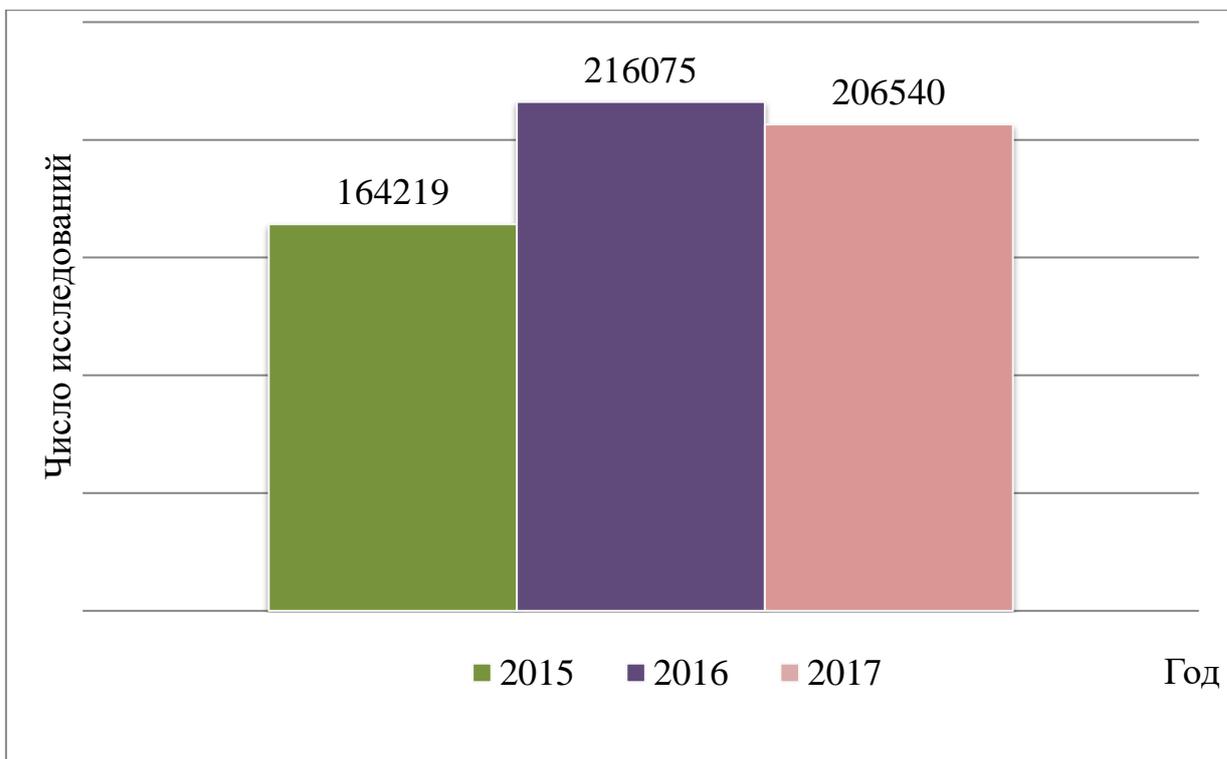


Рисунок 2 - Число проведенных гистологических исследований в ПАО №1 КГБУЗ «Красноярское краевое патолого - анатомическое бюро» за 2015 - 2017 год

Количество гистологических исследований биопсийного (операционного) материала в патолого – анатомическом отделении № 1 в 2015 - 2017 гг. рост гистологических исследований снижен, а в 2016 г. увеличен.



Рисунок 3–Количество взятого биопсийного(операционного) материала и исследований на случаи (пациентов) в ПАО №1 КГБУЗ «Красноярское краевое патолого - анатомическое бюро» за 2015 - 2017 год

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ литературных источников позволил детально изучить гистохимические методы в современной лаборатории

2. Итог практической части – самостоятельно приготовленные препараты с помощью гистохимических методов

3. В ходе изучения статистических данных за три года в современной лаборатории, исследования с помощью гистохимических методов постепенно снижается, так как эти методы являются самыми дорогостоящими.

4. Чаще всего пользуются гистохимическими методами окраски такими как: окраска гематоксилином и эозином, окраска пикрофуксином по Ван - Гизону и дополнительными по требованию врача являются: комбинированная окраска на креатинин и слизь по Крейбергу, окраска хеликобактерий по методу Романовского - Гимза, окраска амилоида красным Конго - Рот, окрашивание липидов и липоидов (судан III).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. ИИЛ, М., 2014, стр 25 -26.
2. Луппа Х. Основы гистохимии, Мир, М., 2015, стр 28 – 32.
3. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. Наука, М., 2014, стр 13 – 18.
4. Методы цитологического анализа. Ред. Меллорс Р., ИИЛ, М., 2016, стр 111 – 112.
5. Введение в количественную цитохимию. Ред. Вейд Г., Мир, М., 2014, стр 88.
6. Черноградская Н.А., Розанов Ю.М., Богданова М.С., Боровиков Ю.С. Ультрафиолетовая флуоресценция клеток, Л., Наука, 2014, стр 99 – 105.
7. Бродский В.Я. Трофика клетки. Наука, М., 2015, стр 8.
8. Хруст Ю.Р., Литинская Л.Л., Соколова Г.А., Оглобина Т.А. Методическое пособие по количественной цитохимии. Изд. МГУ, М., 2016, стр 19.
9. Журавлева Т.Б., Прочуханов Р.А. (ред.) Введение в количественную гистохимию ферментов. Медицина, М., 2016, стр 22 – 44.
10. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии в гистологической технике - М.: Медицина 2014, стр 14 – 16.
11. Гайер Г. Электронная гистохимия М.: Мир, 2014, стр 5.
12. Завалицкая Л.И., Литвинова Л.В. Методика, улучшающая прикрепление парафиновых срезов к предметным стеклам, 2015, стр 51 – 54.
13. Авдеев М. И, Курс гистологической медицины. - М., 2015, стр 61.
14. Касьянов М. И, Очерки медицинской гистологии. - М., 2016, стр 42 – 43.
15. Науменко В. Г, Митяева Н. А, Гистологический и цитологический методы исследования в гистологии (руководство). -М. 2014, стр 23 – 35.

16. Прозоровский В. И, Кантер Э.И, Правила взятия, фиксации, обработки, исследования, исследования, хранения и документации трупного материала, предназначенного для гистологического исследования//Сборник организационно-методических материалов по гистологии. -М., 2016, стр 16 – 27.
17. Быков В. Л, Цитология и общая гистология. — СПб.: СОТИС, 2015, стр 74 – 76.
18. Все лекции по гистологии. Статьи [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://www.studfiles.ru/preview/1659521> - Загл. с экрана.
19. Пропитывание и заливка гистологического материала - Основы гистологии [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://lekmed.ru/info/arhivy/osnovy-gistologii-58.html> - Загл. с экрана.
20. Гистохимические методы исследования – [Электронный ресурс]- Режим доступа: [http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc\\_medicine/9018/Гистохимические](http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_medicine/9018/Гистохимические) - Загл. с экрана.
21. Список препаратов по частной гистологии [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/histology/histology/r0/slst> - Загл. с экрана.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А (Микротом ротационный и санный)

Ротационные микротомы предназначены для резки парафиновых блоков, с их помощью можно получать серийные срезы.



Рисунок 4 - Ротационный микротом

Санные микротомы характеризуются горизонтальным движением ножа и вертикальным подъемом блокодержателя.



Рисунок 5 – Санный микротом

ПРИЛОЖЕНИЕ Б (Современное техническое оборудование в патолого –  
анатомическом отделении)

Автоматический прибор для окраски гистологических препаратов  
мультистейнер Tissue -Tek Prisma



Рисунок 6 – Автоматический мультистейнер Tissue-Tek Prisma

Автоматическая заливочная станция мультистейнер Tissue-Tek Prisma



Рисунок 7 – Автоматическая заливочная станция мультистейнер Tissue-Tek Prisma

ПРИЛОЖЕНИЕ В (Объемы выполненных исследований за 2015 – 2017 год)  
 Таблица 3 - Объемы выполненных исследований в КГБУЗ ККПАБ за 2015 – 2017 год

№ пп	Патолого-анатомическое отделение	Год	Патолого-анатомические вскрытия	Блоки (кусочек) секционного материала	Исследования биопсийного и операционного материала			
			ВСЕГО пациентов		Случаи	Блоки (кусочки)	Исследования (окраска срезов)	К-во исследований на 1 случай
1.	КГБУЗ ККПАБ	2015г.	<b>1 284</b>	<b>23 300</b> 18,0 кус.	84 913	430362 5,2 кус.	<b>540 341</b>	6,4 иссл.
2.	КГБУЗ ККПАБ	2016г.	<b>1 361</b>	<b>23 937</b> 17,6 кус.	83 718	445 846 5,3 кус.	<b>494 449</b>	5,9 иссл.
3.	КГБУЗ ККПАБ	2017г.	<b>1 339</b>	<b>24 034</b> 17,9 кус.	66 580	345 580 5,2 кус.	<b>402 183</b>	6,0 иссл.
			На 1 секционный случай врач вырезает до 12-20 кусочков		Для исследования 1 случая О-Б материала врач вырезает до 5 кус. и заказывает дополн. окраски (исследования)			

Таблица 4 - Объемы выполненных исследований в ПАО №1 КГБУЗ ККПАБ за 2015 - 2017 год

№ пп	Патолого-анатомическое отделение	Год	Патолого-анатомические вскрытия	Блоки (кусочек) секционного материала	Исследования биопсийного и операционного материала			
			ВСЕГО пациентов		Случаи	Блоки (кусочки)	Исследования (окраска срезов)	К-во исследований на 1 случай
1.	Патолого-анатомическое отделение № 1	2015г.	<b>801</b>	<b>12 963</b> 16,2 кус.	30 581	168 421 5,5 кус.	<b>206 540</b>	6,8 иссл.
2.	Патолого-анатомическое отделение № 1	2016г.	<b>884</b>	<b>12 881</b> 14,6 кус.	31 328	171 268 5,5 кус.	<b>216 075</b>	6,9 иссл.
3.	Патолого-анатомическое отделение № 1	2017г.	<b>904</b>	<b>14 386</b> 16 кус.	27 327	143 796 5,3 кус.	<b>164 219</b>	6,0 иссл.
			На 1 секционный случай врач вырезает до 12-20 кусочков		Для исследования 1 случая О-Б материала врач вырезает до 5 кус. и заказывает дополн. окраски (исследования)			

