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

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

# Дневник

производственной практики

по модулю «Проведение лабораторных гистологических исследований»

**Хертек Даяна Андреевна**

ФИО

Место прохождения практики

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 (медицинская организация, отделение)

с « 27 »апреля 2020 г. по «15 »мая 2020 г.

Руководители практики:

Общий – Ф.И.О. (его должность) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Непосредственный – Ф.И.О. (его должность) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Методический – Ф.И.О. (его должность) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Красноярск, 2020

**Содержание**

1. Цели и задачи практики
2. Знания, умения, практический опыт, которыми должен овладеть студент после прохождения практики 3. Тематический план
3. График прохождения практики
4. Инструктаж по технике безопасности
5. Содержание и объем проведенной работы
6. Манипуляционный лист (Лист лабораторных / химических исследований)
7. Отчет (цифровой, текстовой)

**Цели и задачи практики:**

* 1. Закрепление в производственных условиях профессиональных умений и навыков по методам гистологических исследований.
	2. Расширение и углубление теоретических знаний и практических умений по методам гистологических исследований.
	3. Повышение профессиональной компетенции студентов и адаптации их на рабочем месте, проверка возможностей самостоятельной работы.
	4. Воспитание трудовой дисциплины и профессиональной ответственности.
	5. Изучение основных форм и методов работы в гистологических лабораториях.

**Программа практики.**

 В результате прохождения практики студенты должны уметь самостоятельно:

* 1. Организовать рабочее место для проведения лабораторных гистологических исследований.
	2. Подготовить лабораторную посуду, инструментарий и оборудование для анализов.
	3. Приготовить растворы, реактивы, дезинфицирующие растворы.
	4. Провести дезинфекцию биоматериала, отработанной посуды, стерилизацию инструментария и лабораторной посуды.
	5. Провести прием, маркировку, регистрацию и хранение поступившего биоматериала.
	6. Регистрировать проведенные исследования.
	7. Вести учетно-отчетную документацию.
	8. Пользоваться приборами в лаборатории.
	9. Выполнять гистологические манипуляции по соответствующим методикам.

**По окончании практики студент должен представить в колледж следующие документы:**

* 1. Дневник с оценкой за практику, заверенный подписью общего руководителя и печатью ККПАБ.
	2. Характеристику, заверенную подписью руководителя практики и печатью ККПАБ.
	3. Текстовый отчет по практике (положительные и отрицательные стороны практики, предложения по улучшению подготовки в колледже, организации и проведению практики).
	4. Выполненную самостоятельную работу.

**В результате производственной практики обучающийся должен: Приобрести практический опыт:**

* приготовления гистологических препаратов **Освоить умения:**
* готовить материал, реактивы, лабораторную посуду и аппаратуру для гистологического исследования;
* проводить гистологическую обработку тканей и готовить микропрепараты для исследований;
* оценивать качество приготовленных гистологических препаратов;
* архивировать оставшийся от исследования материал;
* оформлять учетно-отчетную документацию;
* проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**Знать:**

* задачи, структуру, оборудование, правила работы и техники безопасности в патогистологической лаборатории;
* правила взятия, обработки и архивирования материала для гистологического исследования;
* критерии качества гистологических препаратов;
* морфофункциональную характеристику органов и тканей человека.

**Тематический план**

**4/6 семестр**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№**  | **Наименование разделов и тем практики**  | **Всего часов**  |
| **4/6 семестр**  | **108**  |
| 1  | **Ознакомление с правилами работы в ККПАБ:** * изучение нормативных документов, регламентирующих санитарнопротивоэпидемический режим в ККПАБ.
* ознакомление с правилами работы в гистологических лабораториях.
 | 6  |
| 2  | **Подготовка материала к гистологическим исследованиям:** * прием, маркировка, регистрация биоматериала.
* устройство микроскопов и техника микроскопирования.

-устройствосанного микротома и микротомных ножей.  | 12  |
| 3  | **Организация рабочего места:** - приготовление реактивов, подготовка оборудования, посуды для исследования  | 6  |
| 4  | **Техника приготовления гистологических препаратов:** * приготовление гистологических срезов;
* уплотнение материала;
* обезвоживание;
* фиксация;
* техника окрашивания срезов:

а) предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской.-предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской.б) проведение окрашивания срезов, наклеенных на предметные стекла и свободноплавающих срезов.в) просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы) ;* обработка биопсийного материала;
* приготовление препаратов для электронно – микроскопического исследования
 | 66  |
| 5  | **Регистрация результатов исследования.**  | 6  |
| 6  | **Выполнение мер санитарно-эпидемиологического режима в** **ККПАБ :** - проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; - утилизация отработанного материала.  | 6  |
| **Вид промежуточной аттестации**  | Дифференцированный зачет  | 6  |
|  **Итого**  | **108**  |

**График прохождения практики.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ п/п**  | **Дата**  | **Часы**  | **оценка**  | **Подпись руководителя.**  |
| 1  |    |   |   |   |
| 2  |    |   |   |   |
| 3  |    |   |   |   |
| 4  |    |   |   |   |
| 5  |    |   |   |   |
| 6  |    |   |   |   |
| 7  |    |   |   |   |
| 8  |    |   |   |   |
| 9  |    |   |   |   |
| 10  |    |   |   |   |
| 11  |    |   |   |   |
| 12  |    |   |   |   |
| 13  |    |   |   |   |
| 14  |    |   |   |   |
| 15  |    |   |   |   |
| 16  |    |   |   |   |
| 17  |   |   |   |   |
| 18  |   |   |   |   |

**1 день.**

Ответить на вопросы:

1. Органы мужской половой системы, строение семенника и его функция.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **орган** | **строение** | **функция** |
| Яички (=семенники = тестикулы) | Парные мужские половые железы. Расположены в мошонке.Строение:* фиброзная наружная оболочка (защитная функция);
* внутренняя паренхима состоит из извитых семенных канальцев.

У половозрелого мужчины стенки извитых семенных канальцев яичка выстланы слоем сперматогенного эпителия, состоящего из сперматогенных клеток (сперматогенная функция) и **поддерживающих клеток — клеток Сертоли** (защитная (**гематотестикулярный барьер**), питательная и транспортная функция). Между извитыми семенными канальцами расположены клетки Ляйдига, снтезирующие основной мужской половой гормон — **тестостерон** (см. ниже).К семенникам прикреплены поднимающие их мышцы (функция: терморегуляция) | * **экзокринная функция:** образование сперматозоидов;
* **эндокринная функция**: секреция половых гормонов — андрогенов.
 |
| Придатки яичек | Небольшие парные тела, прилежащие к заднему краю яичек. Формируются из семенных канальцев, выходящих из яичек, т. о. являются семявыносящими путями.Стенки протока придатка имеют железистые клетки и гладкие мышечные волокна; благодаря перистальтическим сокращениям сперма продвигается в семявыносящий проток. | * резервуар для накопления сперматозоидов;
* секреция веществ, разжижающих сперму и стимулирующих созревание сперматозоидов.
 |
| Семявыносящий проток | Парные органы длиной около 50 см, диаметром около 3 мм (диаметр просвета протока 0,5 мм).Является непосредственным продолжением протока придатка яичка и заканчивается у места слияния с выделительным протоком **семенного пузырька**.Стенка семявыносящего протока состоит из слизистой, мышечной и адвентициальной оболочек. Толстая мышечная оболочка придает стенке семявыносящего протока почти хрящевую плотность.  | Семявыносящие пути |
| Семенные пузырьки | Парные органы: клубочки сильно извитой трубочки (длина трубочки до 15 см).Оболочки пузырька:* слизистая оболочка образует многочисленные складки. Ее клетки секретируют в просвет пузырьков густой секрет желтоватого цвета, который является компонентом спермы. В состав секрета входят фруктоза и глобулины.
* мышечная оболочка хорошо развита;
* соединительнотканная (адвентициальная) оболочка богата эластическими волокнами.
 | Секрет семенных пузырьков:* питание сперматозоидов (фруктоза);
* иммунная защита сперматозоидов (иммуноглобулины).
 |
| Семявыбрасывающий проток | Проток (длина около 2 см) от места слияния семявыносящего протока с выделительным протоком семенных пузырьков до мочеиспускательного канала.Проходит насквозь предстательную железу. | Семявыносящие пути |
| Предстательная железа (простата) | Непарный железисто-мышечный орган (2х3 см, вес 20 г), расположенный под мочевым пузырем. По форме напоминает каштан.Через простату проходит начальный отдел мочеиспускательного канала и семявыбрасывающие протоки. Простата состоит из железистой паренхимы и гладкой мышечной ткани.Гладкая мышечная ткань простаты вместе с тканью мочевого пузыря образует внутренний (непроизвольный) сфинктер мочеиспускательного канала. Сокращение мышечных клеток в момент эякуляции способствует выбрасыванию секрета простаты.На секрецию простатических желез влияют андрогены, синтезируемые семенниками.  | * Эндокринная функция: секреция простагландинов (физиологически активные вещества с широким спектром действия, см. ниже);
* стимуляция подвижности сперматозоидов;
* регуляция секреторной активности семенников
 |
| Куперовы (бульбоуретральные) железы | Парные округлые альвеолярно-трубчатые железы величиной с горошину. Протоки открываются в мужской мочеиспускательный канал. | Слабощелочной вязкий секрет нейтрализует остатки мочи в мочеиспускательном канале, подготавливая его для прохождения спермы. |
| Мошонка | Наружный кожно-фасциальный мешок, содержащий яички и их придатки. Состоит из семи слоев (оболочек яичек), которые являются производными передней брюшной стенки.Мошонка разделена на две разобщенные камеры, каждая из которых содержит одно яичко.В коже мошонки многочисленные сальные и потовые железы, редкие волосяные луковицы. | * механическая защита яичек и их придатков;
* терморегуляция: поддержание температуры ниже, чем температура тела (необходимое условие для сперматогенеза).
 |
| Половой член | Состоит из 2 пещеристых и 1 губчатого тела. Каждое пещеристое и губчатое тело покрыто плотной соединительнотканной оболочкой, лишенной мышечных клеток.Пещеристые тела прилегают друг к другу, образуя продольный желобок, в который входит губчатое тело. Оно начинается у лобковой кости луковицей члена, а заканчивается головкой.В состоянии возбуждения пещерки наполняются кровью, и пол член увеличивается в размерах (**эрекция**).Покрыт кожей, которая на головке имеет складку — крайнюю плоть. Многочисленные железы крайней плоти выделяют секрет — **смегму**(функция: уменьшение трения головки о крайнюю плоть). | * выведение мочи;
* введение спермы в
 |

1. **Ткань, белочной оболочки семенника, строение семенного извитого канальца.**

Семенники это парный орган элипсоидной формы, располагающийся в мошонке и окруженный несколькими оболочками из которых непосредственно прилежит к яичку белочная оболочка, состоящая из плотной волокнистой соединительной ткани. Она по заднему краю яичка утолщается образуя средостение. От средостения в паренхиму отходят перегородки (септы), которые делят яичко в среднем на 250 долек, которые имеют коническую форму. В каждой дольке содержаться 1-4 извитых семенных канальцев, длинной 30-80 см. в стенке этих канальцев происходит сперматогенез.

Строение извитых семенных канальцев

Стенка извитых семенных канальцев иначе называется собственная оболочка и состоит из трех слоев:

1. Наружный – волокнистый слой, который состоит из наружной части, представленной фибробласто-подобными клетками и внутренней части – представленной коллагеновыми волокнами.

2. Средний – миоидный, он представлен миоидными клетками, которые по строению сходны с гладко-мышечными клетками, т.к. имеют веретенообразную форму, соединяются друг с другом конец в конец, плотными контактами. Благодаря их сокращениям происходит изменение просвета извитых семенных канальцев.

3. Внутренний – базальный, состоит из коллагеновых волокон, под данным слоем располагается базальная мембрана, на которой находится эпителио-сперматогенный слой (сперматогенный эпителий). Он состоит из эпителия циломического типа, который представлен собственно эпителиальными клетками и сперматогенными клетками, находящимися на разных этапах своего развития. Собственно-эпителиальные клетки или поддерживающие клетки или сустентоциты или фолликулярные клетки или клетки сертоли.

**3. Эпителиосперматогенный слой семенного извитого канальца.**

Эпителиосперматогенный слой извитых семенных канальцев состоит из 2-х клеточных дифферонов: спрематогенные клетки и поддерживающие клетки.

Сперматогенные клетки – половые клетки на самых разных стадиях сперматогенеза:

а) темные стволовые сперматогонии типа А – медленно делящиеся долгоживущие резервные стволовые клетки; располагаются в самых периферических зонах канальца (ближе к базальной мембране);

б) светлые стволовые сперматогонии типа А – быстро обновляющиеся клетки, находятся на I стадии сперматогенеза - стадии размножения;

в) в следующем слое ближе к просвету канальца располагаются сперматоциты I порядка, находящиеся на стадии роста. Светлые стволовые сперматогонии типа А и сперматоциты I порядка остаются соединенными друг с другом при помощи цитоплазматических мостиков – единственный пример в человеческом организме особой формы организации живого вещества – синцития;

г) в следующем слое ближе к просвету канальца располагаются клетки, находящиеся на стадии созревания: сперматоцит I порядка совершает быстро следующих друг за другом 2 деления (мейоз) – в результате первого деления образуются сперматоциты II порядка, второго деления – сперматиды;

д) самые поверхностные клетки семенных канальцев – сперматозоиды образуются из сперматидов в ходе последней стадии сперматогенеза – стадии формирования, завершающуюся лишь в придатке яичка.

**4. Строение и функция поддерживающих клеток.**

Форма ядер поддерживающих клеток зависит от того, на какой стадии формирования находятся сперматиды. Так, после второго мейотического деления сперматоцитов второго порядка, вновь образованные из них сперматиды погружаются в плазмолемму многочисленных отростков поддерживающих клеток и таким образом дозревают до спермий, находясь в своеобразных цитоплазматических карманах сустентоцитов. В этом случае форма ядер имеет овальную форму и располагается параллельно базальной мембране канальца. После отхождения спермия от поддерживающих клеток, их ядра обретают прежнюю форму.

**Функции поддерживающих клеток** многообразны:

1. Обеспечивают питание сперматогенным клеткам.

2. Вырабатывают жидкую среду канальцев.

3. Служат опорой для половых клеток.

4. Способствуют продвижению формирующихся половых клеток к просвету канальца (за счет сокращения имеющихся в них цитоплазме многочисленных сократительных микрофиламентов).

**5. Периоды развития мужской половой клетки.**

Период роста мужских половых клеток характерен тем, что масса их ядер и цитоплазмы увеличиваются примерно в 4 раза, и они превращаются в сперматоциты 1-го порядка (2п, 2с). В конце периода роста в них происходит редупликация ДНК и они становятся тетраплоидными клетками (2л, 4с).

**6. Особенности строения половых клеток на различных фазах сперматогенеза.**

Сперматогенез -процесс образования мужских половых клеток -сперматозоидов. Проходит в семенниках в четыре стадии:

1. Фаза размножения: несколько последовательных делений сперматогониев митозом. Фаза необходима для увеличения количества исходных клеток.

2. Фаза роста: Сперматогонии переходят в разряд сперматоцитов первого порядка,увеличиваясь в размерах.

3. Фаза созревания: Мейоз. Сперматоциты первого порядка сначала становятся сперматоцитами второго порядка,затем сперматидами. (1 сперматоцит=4 сперматиды)

4. Фаза формирования: Сперматиды превращаются в зрелый сперматозоид,готовый к оплодотворению яйцеклетки.

Сперматогенез в организме мужчины проходит постоянно,начиная с полового созревания.

**7. Микроскопическое строение клеток семенника, вырабатывающих мужские половые гормоны, гормональная регуляция процессов сперматогенеза.**

Строение семенника снаружи покрыт серозной оболочкой (брюшиной), под кот. находится белочная оболочка, состоящая из плотной соед.ткани. По заднему краю семенника белочная оболочка утолщается и образуется средостение, от кот. отходит множество перегородок, разделяющих семенник на 250 долек. В каждой дольке находится 1-4 извитых семенных канальца. Всего в яичке 350-400 канальцев. Длина канальца 30-70см, диаметр 150-200 мкм. Между извитыми канальцами расположены интерстициальные клетки (гландулоциты, клетки Лейдига), секретирующие тестостерон. Внутри извитых канальцев- эпителиосперматогенный слой, состоящий из двух типов клеток: 1) сустентоцитов и 2) развивающихся половых клеток, а именно: а) сперматогонии –лежат на базальной мембране; б) во втором слое сперматоциты 1го и 2го порядков; в) в третьем – сперматиды г) в четвертом – сперматозоиды;

**8. Особенности строения и функция различных отделав семявыводящих путей.**

**Семявыносящие пути выполняют следующие функции:**

· депонирование, трофика, кондиционирование спермы;

· обеспечение массированного выброса спермы во время коитуса;

· секреторная функция;

· эндокринная функция.

Основной тканью семявыносящих путей является эпителий. Он имеет разное строение в различных отделах и обеспечивает транспорт и дозревание сперматозоидов, так как сперматозоиды, образующиеся в извитых канальцах, сначала неподвижные. Их продвижение по семенным путям обеспечивается за счет давления вновь образующихся сперматозодов, движения ресничек эпителиоцитов и сокращения мышечной оболочки семявыносящих путей.

**К семявыносящим путям относятся**

· прямые канальцы;

· канальцы сети;

· выносящие канальцы головки придатка;

· канал придатка;

· семявыносящий и семяизвергающий протоки;

· мочеиспускательный канал.

**9. Строение и функция предстательной железы и семенных пузырьков.**

**Строение предстательной железы.**Снаружи предстательная железа покрыта **капсулой,***cdpsula prostatica,*Капсула состоит из желе­зистой ткани, образующей железистую **паренхиму,***parenchyma,*а также из гладкой мышечной ткани, составляющей **мышечное вещество,***substdntia musculdris.*

**Сосуды и нервы предстательной железы.**Кровоснабжение предстательной железы осуществляется многочисленными мел­кими артериальными ветвями, отходящими от нижних мочепузырных и средних прямокишечных артерий (из системы внут­ренних подвздошных артерий). Венозная кровь от предстатель­ной железы оттекает в **венозное сплетение простаты,**из него — в нижние мочепузырные вены, которые впадают в правую и ле­вую внутренние подвздошные вены. Лимфатические сосуды пред­стательной железы впадают во внутренние подвздошные лим­фатические узлы.

**Семенной пузырек*, vesicula (glandula) seminalis,***— парный орган, располагающийся в полости малого таза латерально от ампулы семявыносящего протока, сверху от предстательной железы, сзади и сбоку от дна мочевого пузыря. Се­менной пузырек является секреторным органом. Семенной пузырек имеет переднюю и заднюю поверхность.

**Семенной пузырёк имеет 3 оболочки**: адвентициальную оболочку, *tunica adventitia,*мышечная оболочка, *tunica muscularis,* слизистая оболочка, *tunica mucosa.*

**10. Особенности строения и функции органов женской половой системы.**

Женская половая система состоит из непосредственно половых органов, молочных желез, некоторых отделов головного мозга и эндокринных желез, регулирующих работу половых органов.

Женские половые органы делятся на внутренние и наружные. Наружные органы: половые губы, влагалище, промежность. Внутренние органы: матка, шейка матки, маточные трубы, яичники.

Основной функцией женской половой системы является репродуктивная функция. Это значит, что зачатие нового организма и его вынашивание происходит в организме женщины. Эта функция выполняется путем взаимодействия нескольких органов, относящихся к женской половой системе. Это взаимодействие обеспечивает гормональная регуляция. Именно эта регуляция является главным звеном в реализации репродуктивной функции женского организма.

**11. Общий план строения яичника и его функция.**

Строение яичника:

Если рассмотреть яичник в разрезе, то можно увидеть, что он представляет собой «слоеный пирог».

Верхняя оболочка представлена одним слоем зародышевого эпителия.

Далее располагается белочный слой плотной структуры, являющийся соединительной тканью. Именно она формирует строму яичника, имеющую эластичные волокна.

Следующий слой - паренхима – подразделяется на два подслоя. Внутренний именуется мозговым веществом. Состоит он из соединительной ткани рыхлой текстуры, насыщенной лимфатическими и кровеносными сосудами. Внешний представлен корковым веществом плотной структуры. В нем размещаются еще маленькие (только созревающие) и везикулярные фолликулы (иначе они еще называются граафовыми пузырьками). По самому краю яичника располагаются зрелые, готовые к выходу фолликулы. Они достигают 2 см в окружности, покрыты текой (оболочкой) и содержат в себе жидкость. Внутри фолликул представлен зернистым слоем, в котором расположен яйценосный бугорок, содержащий яйцеклетку.

Основная функция яичников в организме женщины заключается в производстве ооцитов (яйцеклеток) для оплодотворения и секреции половых гормонов, эстрогена и прогестерона - генеративная функция яичников.

Существует несколько сходств между тем, какие функции выполняют яичники и семенники. Семенники и яичники в ходе онтогенеза развиваются из одного зародышевого листка. Клетки Лейдига (клетки, продуцирующие сперму), семенные канальцы и интерстиций семенников в яичниках представлены клетками гранулезы, первичными фолликулами и стромой соответственно. Функции яичников и семенников одинаково контролируются гонадотропинами, вырабатываемыми гипофизом.

**12. Строение коркового и мозгового вещества яичника.**

Корковое вещество образовано так называемыми фолликулами различной степени зрелости, расположенными в соединительнотканной строме. Примордиальные фолликулы состоят из овоцита в диплотене профазы мейоза, окруженного одним слоем плоских клеток фолликулярного эпителия и базальной мембраной. Вокруг цитолеммы появляется вторичная, блестящая зона, снаружи располагаются в 1—2 слоя кубические фолликулярные клетки на базальной мембране. В цитоплазме этих клеток хорошо развиты аппарат Гольджи, рибосомы и полирибосомы.

Мозговое вещество состоит из соединительной ткани, в которой проходят магистральные кровеносные сосуды и нервы, эпителиальные тяжи — остатки канальцев первичной почки.

**13. Процесс развития фолликулов в яичнике.**

Процессом созревания управляют гормоны, в частности, прогестерон и лютеин. Если баланс этих гормонов нарушен, то это приводит, прежде всего, к нарушению менструального цикла. В его первой фазе, при нормальном гормональном фоне, запускается процесс созревания фолликула. Одновременно могут развиваться до десяти фолликулов, но только у доминирующего есть шанс достигнуть необходимых размеров. Оставшиеся образования должны деградировать, если гормональный баланс не нарушен. В противном случае они продолжают развитие и сдерживают рост доминирующего фолликула.

Нормальный менструальный цикл является признаком отсутствия проблем с созреванием фолликулов. Перед овуляцией женщины могут ощущать тянущие боли внизу живота, перевозбуждение или раздражительность, перепады настроения; выделения влагалища могут стать более обильными и густыми. Одним из признаков созревания фолликула также является незначительное снижение температуры за сутки или за 12 часов до момента овуляции. Затем ректальная температура повышается на несколько десятых градуса Цельсия. Отследить выход яйцеклетки из фолликула можно также и при помощи гормональных тестов: перед овуляцией уровень прогестерона повышается.

Обычно менструальный цикл сопровождается созреванием одного единственного фолликула, но бывают случаи, когда одновременно созревают два и более. Это не является патологией, но результатом созревания нескольких фолликул нередко оказывается многоплодная беременность.

**14. Структуры, имеющиеся в зрелом пузырчатом фолликуле.**

Оболочка зрелого фолликула состоит из наружной части — theca externa, представляющей довольно грубые пучки соединительной ткани, расположенные преимущественно меридионально и параллельно экватору. Между пучками соединительной ткани залегают кровеносные и лимфатические сосуды. Глубже располагается theca interna, состоящая из более нежных пучков соединительной ткани, богатая в наиболее глубоких отделах клеточными элементами соединительнотканной природы. Theca interna обильно васкуляризована сетью капилляров, возникающих из сосудов theca externa. Клеточные элементы внутренней соединительнотканной оболочки фолликула имеют вид уплощенных или веретенообразных клеток, в зрелом фолликуле достигающих значительных размеров. Ввиду обильной васкуляризации они являются несомненно посредниками в ассимиляции из крови питательных материалов и передаче их фолликулярному эпителию. Обильные грануляции выполняют протоплазму этих клеток и чем более подвигается в своей эволюции фолликул, тем богаче гранулами клетки. Гранулы по своей природе жировые и у некоторых млекопитающих окрашены в желтый цвет благодаря содержащемуся здесь пигменту лютеину.

**15. Овуляция, микроскопическое строение и функция желтого тела.**

 Выход яйцеклетки из фолликула называется **овуляцией**, а процесс перемещения яйцеклетки по маточным трубам в матку продолжается 48 часов.

После овуляции края лопнувшего фолликула собираются, образуя полость. Она наполняется клетками, содержащими жироподобное вещество и приобретает желтый цвет. Эта структура называется желтым телом. Она вырабатывает гормон прогестерон и является временной эндокринной железой. Дальнейшая “судьба” желтого тела зависит от того наступила беременность или нет.

После оплодотворения желтое тело продолжает работать всю беременность, вырабатывая прогестерон, необходимый для ее сохранения. Если же этого не произошло, временная железа атрофируется и превращается в рубец – белое тело, которое впоследствии исчезает.

**16. Атрезия фолликулов. Атретическое тело.**

Атрезия фолликула – это его обратное развитие. Чтобы понять, что это такое, опасен ли этот процесс, нужно разобраться в особенностях женской репродуктивной системы.

**Стадии развития**

В женских яичниках вырабатываются фолликулы (их еще называют граафовы пузырьки). Состоят они из яйцеклетки, нескольких слоев защитного эпителия и соединительных тканей. Созревание фолликулов происходит беспрерывно – от начала внутриутробного развития девочки до преклонного возраста.

Стадии развития:

* примордиальная – образуются клетки до момента рождения, большая их часть гибнет (можно насчитать около 2 миллионов клеток, из которых остается 300 тысяч);
* преантральная – преобразование начинается во время полового созревания, происходит увеличение ядра;
* антральная – характеризуется резким ростом клеток, происходит выделение эстрогенов;
* преовуляторная – фолликул вырастает до 20 мм, на нем располагается яйцеклетка.

**Атретическое тело** ([лат.](https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/6165) *corpus atreticum*) — временная [эндокринная железа](https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1211468) в составе [яичника](https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1219458).

* Источники развития: первичные, вторичные и третичные [фолликулы](https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/386714).
* Строение: 1) погибший [овоцит](https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1071569) первого порядка, 2) остатки блестящей оболочки, 3) остатки фолликулярного эпителия лучистого венца, 4) гипертрофированные интерстициальные клетки (текациты).
* Функции: уничтожение мутировавших овоцитов, предупреждение многоплодия, эндокринная ([андрогены](https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/44527), [эстрогены](https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/44544)), регуляция циклических

**17. Структуры, осуществляющие репродуктивную и эндокринную функции в яичниках.**

**Яичники выполняют две основные функции:** генеративную функцию (образование женских половых клеток) и эндокринную функцию (выработка половых гормонов).

**Развитие органов женской половой системы (как и мужской)** тесно связано с развитием органов мочевыделительной системы. **Строма яйчников развивается из мезенхимы первичной почки** (мезонефроса), в которую врастают т.н. половые шнуры из целомического (мезодермального) эпителия половых валиков. Овогонии (будущие половые клетки) обособляются намного раньше - из мезенхимы стенки желточного мешка. **Маточные трубы, матка и влагалище развиваются из парамезонефральных, или мюллеровых, протоков.**

Дифференцировка яичника наступает к 6-й неделе эмбриогенеза. В эмбриогенезе яичников усиленное развитие мезенхимы происходит в основании тел первичных почек.

**18. Особенности строения матки, маточных труб, влагалища.**
**Матка** (uterus) — мышечный орган, предназначенный для осуществления внутриутробного развития плода.
Строение. Стенка матки состоит из трех оболочек:
слизистой оболочки - эндометрия;
мышечной оболочки - миометрия;
серозной оболочки - периметрия.
**Маточные трубы** (яйцеводы, Фаллопиевы трубы) — парные органы, по которым яйцо из яичников проходит в матку.
Строение. Стенка яйцевода имеет три оболочки: слизистую, мышечную и серозную. Слизистая оболочка собрана в крупные разветвленные продольные складки. Она покрыта однослойным призматическим эпителием, который состоит из двух видов клеток — реснитчатых и железистых, секретируюших слизь. Собственная пластинка слизистой оболочки представлены рыхлой волокнистой соединительной тканью. Мышечная оболочка состоит из внутреннего циркулярного или спирального слоя и наружного продольного. Снаружи яйцеводы покрыты серозной оболочкой.
Дистальный конец яйцевода расширяется в воронку и заканчивается бахромкой (фимбриями). В момент овуляции сосуды фимбрий увеличиваются в объеме и воронка при этом плотно охватывает яичник. Передвижение половой клетки по яйцеводу обеспечивается не только движением ресничек эпителиальных клеток, выстилающих полость маточной трубы, но и перистальтическими сокращениями ее мышечной оболочки.

**Стенка влагалища** состоит из слизистой, мышечной и адвентициальной оболочек. В составе слизистой оболочки имеется многослойный плоский неороговевающий эпителий, в котором различают три слоя: базальный, промежуточный и поверхностный, или функциональный.
Эпителий слизистой оболочки влагалища претерпевает значительные ритмические (циклические) изменения в последовательных фазах менструального цикла. В клетках поверхностных слоев эпителия (в его функциональном слое) откладываются зерна кератогиалина, но полного ороговения клеток в норме не происходит. Клетки этого слоя эпителия богаты гликогеном. Распад гликогена под влиянием микробов, всегда обитающих во влагалище, приводит к образованию молочной кислоты, поэтому влагалищная слизь имеет слабокислую реакцию и обладает бактерицидными свойствами, что предохраняет влагалище от развития в нем патогенных микроорганизмов.

**19. Фазы овариально – менструального цикла.**

Овариальный цикл состоит из трех физиологических фаз: фолликулярной, овуляторной и лютеальной, или фазы желтого тела. Фолликулярная фаза овариального цикла начинается у женщины с момента начала менструального кровотечения. Эта фаза варьирует по времени от 9 до 23 дней, но является относительно постоянной у каждой женщины. Овуляторная фаза продолжается примерно 1—3 дня и заканчивается овуляцией.

**20. Строение и функция молочных желез.**

Молочная железа - парный орган, окруженный жировой тканью, что определяет его форму. Кроме того, в связи с возрастом, функциональным состоянием (беременность, кормление) размеры и форма ее значительно изменяется.

Между правой и левой грудью образуется углубление.

В средних участках груди располагается околососковый кружок груди, в центре которого находится грудной сосок. Как околососковый кружок, так и сосок пигментированы.

В состав молочной железы входит тело, жировая и фиброзная ткани.

Тело молочной железы состоит из 15 - 20 раздельно расположенных долей, окруженных жировой тканью.

Основная функция — секреция молока.

**21. Как осуществляется регуляция циклических изменений в матке гормонами яичника и гипофиза?**

**Циклические** **изменения** **в** организме женщины носят двухфазный характер. Первая (фолликулиновая, фолликулярная) фаза цикла определяется созреванием фолликула и яйцеклетки в **яичнике**, после чего **происходят** его разрыв и выход из него яйцеклетки – овуляция. Вторая (лютеиновая) фаза связана с образованием желтого тела. ... находится **гипофиз** и **регуляция** эндокринных желез: гонад (**яичников**), щитовидной железы, надпочечников (рис. 1). В гипоталамусе имеется два типа. нейросекреторных клеток, осуществляющих гипоталамо-гипофизарное. ... Обратное влияние на **гипофиз** половых **гормонов** **яичников** **осуществляется** через вертебральные артерии

**22. Гормоны гипофиза ,влияющие на функциональное состояние яичников.**

Под **влиянием** лютенизирующег **гормона** происходит овуляция, развитее и функционирование желтого тела. Пролактин или лактотропный **гормон** участвует в формировании и **функциональной** деятельности желтого тела и молочных желез. Под воздействие фолликуло-стимулирующего **гормона** осуществляется вступление овоцитов в период большого роста и выработка растущими фолликулами эстрогенов.

1. Гонадотропоциты **гипофиза** находятся под контролем соответствующего либерина (а именно, люлиберина) гипоталамуса. 2. Сами же гонадотропные **гормоны** (ЛГ и ФСГ), а также ЛТГ стимулируют синтез половых **гормонов** в определённом виде клеток **яичника**: ЛГ (лютеинизиру- ющий **гормон**) –. образование андрогенов из холестерина в текальных (интерстициальных) клетках. ФСГ (фолликуло- стимулирующий **гормон**) –. образование эстрогенов из андрогенов в фолликулярных клетках; ЛТГ (лактотропный **гормон**, пролактин или лютеотропный **гормон**)

**Решить ситуационные задачи:**

**Задача №1**. В переходном эпителии мочевого пузыря в зависимости от функционального состояния органа может меняться толщина слоев.

**Вопрос 1:** Объясните, как определить, на препарате растянут или сокращен орган.

**Ответ:** в **растянутом** **состоянии** **органа**, клетки поверхностного **слоя** **переходного** **эпителия**, выстилающего **орган**, будут **растянуты**; в нерастянутом **состоянии** **органа**, поверхностные клетки имеют куполообразную форму. Для обеспечения этой функции в апикальной части клеток поверхностного **слоя** имеется резерв мемебран в виде многочисленных инвагинаций плазмолеммы и в виде стенки специальных мемебранных пузырьков.

**Задача №2** Система извитых и прямых почечных канальцев

**Вопрос 1**: называется...нефрон

**Задача №3** Структуры, через которые происходит фильтрация.

**Вопрос 1:** - это. почечный **фильтр** или фильтрационный барьер

**Задача №4** В гистологическом препарате почки в корковом веществе видны канальцы в поперечном разрезе. Просвет канальцев выстлан призматическим эпителием, имеющим щёточную каёмку.

**Вопрос 1:** К какому отделу нефрона относятся эти канальцы? О чем свидетельствует наличие щеточной каёмки на апикальной поверхности нефроцитов?;

проксимальные извитые канальцы нефрона; щеточная каемка канальцев обеспечивает реабсорбцию воды, солей, белков, жиров и углеводов из первичной мочи обратно в кровь.

**Задача №5** Представлены два препарата мочеточника: в первом препарате в подслизистой основе обнаруживаются железы, во втором - железы не выявляются.

**Вопрос 1**: К какому отделу мочеточника относится первый и второй препараты?;

**Первый** - к нижнему, **второй** - к верхнему **отделам** **мочеточника**.

**Задача №6** Предложены два препарата хрящевой ткани - один окрашен гематоксилин - эозином, другой – орсеином.

**Вопрос 1:** Назовите ткани;

**Гематоксилином** и **эозином** **окрашены** волокнистая и гиалиновая **хрящевые** **ткани** для выявления коллагеновых волокон **1** и **2** типа соответственно, **орсеином** окрашивается эластическая **хрящевая** **ткань** для выявления эластических волокон. Коллагеновые волокна – прочность, эластические волокна – эластичность.

**Задача №7** При бронхиальной астме приступы удушья вызываются спазмами гладких мышечных клеток внутрилегочных бронхов.

**Вопрос 1:** Бронхи, какого калибра задействованы.;

**Задействованы** **бронхи** крупного **калибра**, которые характеризуются на фиксированных препаратах складчатой слизистой оболочкой, благодаря сокращению **гладкой** **мышечной** ткани, многорядным ресничным эпителием, наличием желез, крупных хрящевых пластин.

**Задача №8** При заболевании (эмфиземе) легкие в недостаточной степени спадаются при выдохе.

**Вопрос 1:** Структурные компоненты респираторных отделов повреждены.;

Задача №9 При вдыхании воздуха , загрязненного пылью, в воздухоносные пути и альвеолы попадают инородные частицы.

**Вопрос 1:** Клетки дыхательных путей, принимающие участие в очищении воздуха.;

**в** **очищении** **дыхательных** **путей** **принимают** **участие** реснитчатые **клетки**, которые выстилают почти все духательные **пути**, реснички на поверхности которых направляют ток слизи (которую продуцируют бокаловидные **клетки** и слизистые альвеолярно-трубчатые железы) из бронхиального дерева наружу.

**Задача №10** Даны два микропрепарата из разных отделов воздухоносных путей дыхательной системы. На первом - слизистая оболочка имеет многорядный мерцательный

**На** **первом** - **слизистая** **оболочка** **имеет** **многорядный** **мерцательный** эпителий, хорошо выражены железы и крупные пластинки гиалинового хряща, на втором - эпителий **слизистой** **оболочки** двухрядный **мерцательный**, в нём отсутствуют бокаловидные клетки, нет мышечных элементов, островков хрящевой ткани и желез.

**День 2.**

**Задание печатном виде:** организация рабочего места лаборанта гистолога, прием, маркировка, регистрация биоматериала.

**ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОЧЕГО МЕСТА ЛАБОРАНТА-ГИСТОЛОГА**

Организация рабочего места во многом определяет эффективность и качество работы лаборанта. Рациональная расстановка и размещение лабораторной посуды, инструментария, необходимых растворов и реактивов позволяют без суеты, с наименьшей затратой усилий выполнить за одно и то же время больший объем работы.

У лаборанта должно быть свое рабочее место, с площадью рабочей поверхности не менее 60 х 120 см. Участок стола, предназначенный для непосредственной работы, следует сделать из влагоустойчивого материала, накрыть стеклом и расположить под ним небольшие листы белой и черной бумаги. Это создает соответствующий фон, который облегчает работу с окрашенными (белый лист) и неокрашенными (черный лист) препаратами.

Достаточная освещенность рабочего места является одним из важнейших условий, так как изготовление гистологических препаратов требует значительного напряжения зрения. Необходимо максимально использовать дневной свет. Лучше ставить стол около окна. Однако даже при достаточном свете рабочее место должно быть оснащено специальным осветителем к микроскопу или настольной лампой (с наклоняющейся верхней частью) для обеспечения освещенности. Недостаток света неблагоприятно сказывается на восприятии цвета препарата и затрудняет оценку качества его окраски.

Лаборант должен содержать, свой стол в надлежащем порядке: не загромождать рабочую поверхность лишней посудой и предметами, не применяемыми в данный момент в работе. В любой гистологической лаборатории применяют большой набор разнообразной лабораторной посуды. Следует принять за правило не оставлять использованную посуду длительное время без промывания. Если нет возможности её тут же окончательно вымыть, то необходимо ополоснуть и залить водой. Для удаления засохших реактивов требуется значительно больше усилий, а иногда их вовсе невозможно отмыть.

В повседневной работе лаборанту необходимо иметь набор инструментов, за которым необходим тщательный уход. После применения его следует сразу же мыть (если нужно, очищать) и насухо вытирать (или высушивать в сушильном шкафу).

Хранить инструменты следует в определенном месте. Это облегчает их нахождение и экономит [рабочее время](https://pandia.ru/text/category/vremya_rabochee/).

По окончании рабочего дня лаборант обязан проверить, выключены ли электроприборы, с которыми он работал.

**Прием, маркировка и регистрация материала в гистологической лаборатории**

**Порядок поступления биоматериала в патогистологическую лабораторию:**

1. Материал, предназначенный для гистологического исследования, должен иметь четкую маркировку и сопровождаться направлением.
2. Материал от одного больного должен быть помещен в формалин 10%.
3. Этикетку из плотной, не размокающей в воде бумаги прикрепляют к объекту. Надписи делают только мягким простым карандашом.

При приеме материала в направление и журнал поступлений вписывают порядковый номер патогистологического исследования каждого объекта и время поступления материала , а также указывают характер биопсии- диагностическая, срочная, операционный материал, количество кусочков.

После регистрации из присланного на исследование объекта вырезают необходимое количество кусочков (бипсии.гинекологии и.др).

**3 день.**

**Задание :** Организация рабочего места:

- приготовление реактивов, подготовка оборудования, посуды для исследования;

**Рабочий стол**

 При отсутствии специального стола может быть приспособлен

любой стол (желательно с ящиками) с площадью рабочей поверхности не

менее 60 \*120 см.

Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать

из какого - либо влагоустойчивого материала. Однако участок стола,

предназначенный для непосредственной работы по приготовлению

препаратов, в любом случае необходимо накрыть стеклом и расположить под

ним небольшие (9\*12 см) листы белой или черной бумаги. Этим создаете»

соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными (белый лист) и

не окрашенными (черный лист) объектами. Рекомендуется также на оба

листа нанести контуры предметного стекла с обозначением места

расположения и размеров покровного стекла. Этот простой прием позволяем

рационально разместить на предметном стекле срезы в процессе их

заключения.

Для того, чтобы удобнее расположить необходимое оборудование, следует

иметь двухъярусную полку, для реактивов,, растворов и посуды, которая

устанавливается либо перед работающим (вдоль заднего края стола), либо

сбоку в зависимости от расположения стола относительно источника света.

**Необходимая лабораторная посуда**

 - широкогорлые банки с притертыми пробками различной вместимости от

50 до 200 мл - используют для составления гистологических батарей,

предназначенных для подготовки кусочков тканей к заливке различными

средами. Более крупные банки применяют для фиксации и хранения

кусочков тканей в фиксирующих жидкостях, обработки предметных стекол,

приготовления нейтрального формалина и пр. Вместо банок с притертыми

пробками можно использовать небольшие хозяйственные банки с жестяными

завинчивающимися крышками разного объема.

 - бюксы - небольшие круглые стеклянные стаканчики различного

диаметра и высоты со шлифованными крышками.

 - биологические стаканчики - круглые, овальные или четырехугольные

(как и высокие бюксы) применяют для проводки гистологических срезов,

монтированных на предметных стеклах. Для придания устойчивости и

обеспечения порядка в расстановке их помещают в специальные стойки,

изготовленные из дерева или пластмассы, по нескольку жук в ряд

зависимости от методики обработки.

 - чашки Петри - широкие, плоские стеклянные чашки с крышками -

пригодны для различных манипуляций (окраска свободно плавающих и

наклеенных на предметные стекла срезов, использование в качестве

подставок под бюксы и т.д.).

 - мерная посуда - цилиндры и мензурки различной емкости (от 10 до 250-

500 мл) воронки различных размеров.

 - химические стаканчики - круглые стеклянные стаканчики без крышек

вместимостью 50-100 мл - находят широкое применение при проведении

химических реакций, окраски срезов наклеенных на стекла и т.д.

 - колбы (плоскодонные) вместимостью от 50 до 2 л. Малые колбы

применяют для приготовления и хранения растворов различных красителей,

большие - под дистиллированную воду и прочие жидкости, расходуемые в

больших количествах.

 - пипетки обычные (предназначенные для закапывания лекарств)

используют для накалывания на срезы красителей и различных жидкостей,

градуированные (вместимостью 0,1-100 мл) применяют для отмеривания

малых количеств различных жидкостей. Можно использовать в настоящее

время широко используемые автоматические пипетки различной

вместительности.

 - предметные стекла - прямоугольные пластины размером 76\*25мм

толщиной 1 мм. предназначенные для размещения гистологических срезов,

расположенных на предметных стеклах. Размеры предметных стекол

выбирают в зависимости от площади объекта.

**Инструменты**

 Инструменты, используемые в гистологической лаборатории, включает

пинцеты, скальпели, кровоостанавливающие зажимы, корцанги, шпатели,

препаровальные иглы - прямые и изогнутые, металлические и стеклянные.

Стеклянные иглы необходимы при импрегнации серебром, когда

металлическими иглами пользоваться нельзя, также необходимо иметь

спиртовку, волосяную кисточку для снятия срезов с микротомного ножа,

фильтровальную бумагу, иголки» нитки, плотную бумагу для

этикетирования материала, лейкопластырь и карандаш по стеклу.

- организация рабочего места для проведения микроскопии готовых мазков. Описать устройство санного микротома и микротомных ножей.

В помещении для микроскопии должно быть четыре зоны:

I. Зона для приема и регистрации диагностического материала:

1. Окно для приема образцов.

2. Рабочий стол для осмотра, дезинфекции и последующей регистрации поступающих образцов.

3. Полка для хранения бланков с результатами анализов.

II. Зона для приготовления и окраски мазков:

4. Стол для приготовления мазков (желательно под вытяжкой или в боксе с наличием вытяжного устройства).

5. Контейнер для отработанных инфекционных материалов.

6. Лабораторная раковина для окрашивания мазков.

7. Вспомогательный рабочий стол для сушки мазков.

III. Рабочее место для микроскопии:

8. Стол для микроскопии.

9. Раковина для мытья рук.

IV. Место для регистрации результатов исследований:

10. Стол для учета и регистрации результатов исследований.

11. Рабочий стол и весы.

12. Шкаф для посуды и реактивов.

Помещение должно иметь, по крайней мере, 2 раковины (или одну раковину с двумя отделениями - для окраски мазков и для мытья рук) и четыре стола или 4 изолированных рабочих места.

Столы должны быть удобными для работы. Рабочие поверхности должны быть широкими, гладкими, легко обрабатываться и дезинфицироваться, быть устойчивыми к применяемым химическим веществам.

В лаборатории должны использоваться стулья, высоту сиденья которых можно регулировать.

Необходимо иметь достаточно места для хранения реактивов и архива исследованных мазков.

Доступ в лабораторию должны иметь только ее сотрудники. Диагностический материал поступает в лабораторию через окно для приема на специальный стол. На этом столе должен иметься специальный легко дезинфицируемый лоток, на котором производят осмотр флаконов с материалом. При наличии следов протечки необходимо уничтожить (автоклавирование или кипячение) поврежденный флакон, продезинфицировать обнаруженные вне его следы протечки и запросить новый образец, сделав отметку в сопроводительном бланке.

По завершении приема материала, проверки правильности маркировки поступивших образцов и ее соответствия данным направлений и сопроводительных документов соответствующую информацию вносят в регистрационный лабораторный журнал. Затем материал передают в основную рабочую зону для приготовления мазков.

**Место для микроскопии включает рабочий стол с микроскопом.**

По завершении микроскопического исследования в следующей зоне лаборатории результаты микроскопии заносят в лабораторный регистрационный журнал и в специальные бланки результатов анализа.

Бланки с результатами анализов передают в зону приема материала, откуда они передаются в соответствующие подразделения или учреждения, направившие материал для исследования.

**Микротом.**

 Серийные и отдельные срезы различной толщины и площади для световой

микроскопии готовят при помощи специального устройства — микротома

(рис. 1-1). Различают санные и ротационные микротомы с ручной и

электромеханической системой подачи ножа. Стальной нож микротома

позволяет получить срезы толщиной 0,5–100 мкм из залитых в парафин,

целлоидин или полиэтиленгликоль кусочков ткани. Приготовленные для

последующей световой микроскопии срезы монтируют на предметное

стекло.



Рис. 1. Санный микротом: 1 — микрометрический винт; 2 — перекидной механизм подачи; 3 — винт, фиксирующий стержень основания объектодержателя; 4 — стержень основания объектодержателя.

**Санные микротомы** (рис. 1) используют для получения срезов тканей, предварительно заключенных в парафин или целлоидин. Основные части санного микротома: станина, механизм микроподачи, механизм подъема, объектные салазки с зажимом для ткани, суппорт с ножедержателем. Для получения срезов нефиксированной ткани, а также в случаях, когда необходимо изучить объект в короткий промежуток времени, используют **замораживающие микротомы** (рис.2), снабженные замораживающим столиком, на котором укрепляется исследуемый объект. Столик гибким шлангом соединен с металлическим баллоном, в котором находится жидкая [углекислота](http://www.medical-enc.ru/19/ugolnaya-kislota.shtml). Для замораживания тканевых блоков применяют также термоэлектрический охлаждающий столик (ТОС-1) с селеновым выпрямителем: электрический прибор, корпус которого имеет рабочую охлаждающую поверхность и штуцеры для подведения воды и электрического тока.

В санных микротомах в верхней части станины расположены шлифованные плоскости, по которым скользит массивный подвижный суппорт. В суппорте закреплен держатель ножа, снабженный устройством, которое позволяет установить нож либо поперечно к направлению его движения (для замороженных и парафиновых срезов), либо косо (для целлоидиновых срезов), а также изменять угол наклона ножа. При отведении ножа назад до отказа включается полуавтоматический подающий механизм, поднимающий держатель объекта (столик) на заданное количество микронов.

Резку исследуемого объекта на микротоме производят с помощью специальных микротомных ножей.
Существует несколько разновидностей микротомных ножей. В основу их классификации положена форма лезвия. Ножи типа А имеют одну поверхность вогнутую, а другую ровную. У ножей типа В вогнутость менее выражена.


Рис. 68. Типы микротомных ножей (А, В, С).


Рис. 69.
Приготовление к правке (точке).
I — микротомный нож с обушком; 2 —с ручкой.

 Ножи типа С имеют ровную поверхность с обеих сторон. Сужение ножа от спинки к режущему краю довольно значительное, благодаря чему торцовая часть имеет характерный вид, по которому легко определить тип ножа (рис. 68).
Режущий край микротомного ножа в отличие от обычной бритвы имеет так называемый фасеточный ш л и ф, т. е. угол сечения лезвия, образующийся в результате заточки лезвия под некоторым углом относительно его поверхности.
Ножи типа А делают из относительно мягкой стали, применяют при резке мелких объектов, залитых в целлоидин и состоящих из тканей малой и средней плотности (железы, стенка внутренних органов и т. д.).
Ножи типа В (имеющие меньшую вогнутость лезвия, чем тип А) изготовляют из более твердой стали и употребляют как для приготовления целлоидиновых срезов, так и при резке материала, залитого в целлоидин-парафин.
Ножи т и п а С (из твердой стали) служат для резки наиболее плотного материала (кость, хрящ, кожа), залитого в различные среды, парафиновых блоков, а также для получения срезов при работе на замораживающем микротоме. Длина ножей может быть различной — от 10 до 50 см.
Следует помнить, что получить хороший тонкий срез можно только при наличии правильно заточенного, очень острого микротомного ножа. Существует ряд способов точки ножей, но наиболее надежным до сих пор является ручная точка на специальном точильном камне с последующей шлифовкой на ремне.

Рис. 70.
Порядок движения микротомного ножа при точке.

Однако этот способ требует большой практики и умения, приобретаемых постепенно в процессе работы.
Одним из условий успешного затачивания и правки является сохранение такого положения ножа, когда режущий край и плоскость лезвия находятся под углом друг к другу. Для этого нож должен быть снабжен со стороны спинки специальным металлическим приспособлением — обушком. Для удобства во время работы необходимо иметь привинчивающуюся ручку (рис. 69).
Вначале микротомный нож точат на камне, предварительно смоченном водой или маслом, для чего правой рукой нож берут за ручку, а левой — за свободный конец и кладут на противоположный от себя край камня таким образом, чтобы режущая поверхность соприкасалась со всей поверхностью камня по всей его глубине и была обращена в сторону точащего. Для того чтобы все лезвие затачивалось равномерно, ножу придают такое исходное положение, при котором край ножа совпадает с краем камня (рис. 70). После этого начинают точку движением ножа на себя, постепенно смещая нож в сторону с таким расчетом, чтобы во время движения вся режущая поверхность от одного конца ножа до другого прошла по камню. При этом все время надо следить за постоянным соприкосновением затачиваемого края ножа с поверхностью камня и не надавливать на нож, а лишь водить его в заданном направлении. По окончании движения нож переворачивают через спинку (во избежание повреждения режущего края) и производят движение в обратном направлении. Время затачивания различное, так как оно зависит от многих факторов: состояния ножа, марки стали, качества камня, квалификации точильщика. Точку можно считать законченной, если при рассмотрении в микроскоп (при малом увеличении) режущий край выглядит ровным. При хорошем уходе за ножом, правильной их эксплуатации затачивание занимает 20—30 мин. Запущенные ножи, с крупными зазубринами требуют длительной точки (до нескольких часов).
После того как затачивание закончено, нож следует вымыть, насухо вытереть и направить на ремне (отшлифовать). Точильный ремень должен иметь твердую основу, иначе затрудняется равномерность движения ножа и стирается угол заточки. Если в лаборатории нет фабричного ремня, его можно сделать самим. Для этого необходимо иметь ремень из натуральной кожи (типа поясного ремня шириной 5—6 см) и четырехгранный брусок с шириной граней, равной ширине ремня, и длиной 25—35 см. С помощью столярного или другого подходящего клея куски ремня плотно приклеивают шероховатой поверхностью наружу. Три стороны ремня покрывают равномерным слоем специальной пасты, которая на каждой стороне различается по составу, а четвертую оставляют свободной.
Правку микротомного ножа производят при помощи таких же движений, как и затачивание, только нож располагают на ремне таким образом, чтобы во время движения на себя он был обращен к точащему спинкой, а не режущим краем, как во время точки. Вначале правят на стороне, покрытой грубой пастой (№ 1), затем переходят последовательно на более нежные пасты (№ 2 и 3) и заканчивают шлифовкой на чистом ремне. По каждой поверхности проводят по 20—30 раз. Хорошо отточенный и направленный микротомный нож должен легко перерезать поддерживаемый за один конец человеческий волос и не оставлять борозд на поверхности парафинового блока при его резке.
Для того чтобы придать устойчивость точильному камню и предохранить его от поломки, рекомендуется вставить камень в деревянную оправу, которая должна быть ниже его верхнего края на 0,5—1 см. Рекомендуется также при затачивании и правке бритв камень и ремень закреплять на столе. Это значительно облегчает процесс работы.

Рис. 71.
Угол наклона микротомного ножа.
а— слишком большой; б — слишком маленький; в — правильный (15°).


Рис. 72.
Угол резания микротомного ножа.
а — наиболее распространенный; б — для серийных срезов; в — для резания целлоидиновых блоков.
Существуют и другие способы точки и правки микротомных ножей с помощью более сложных приспособлений.

**4 день**

|  |
| --- |
| **Техника приготовления гистологических препаратов для световой микроскопии** |
| **Основные этапы приготовления гистологических препаратов:**1. взятие материала;2. фиксация;3. промывка в воде;4. обезвоживание и уплотнение;5. заливка;6. приготовление срезов;7.окрашивание;8. заключение срезов. **Краткая характеристика этапов:****1. Взятие материала.**Для гистологического исследования берут кусочки органов и тканей величиной не более 1 см³. Материал желательно получать как можно раньше после смерти людей (метод исследования материала трупа человека — аутопсия).С диагностической целью материал для гистологического исследования может забираться у людей прижизненно с помощью специальных инструментов или во время операций. Этот способ получения материала носит название биопсии.**2.Фиксация.**Взятый для гистологического исследования материал сразу же должен подвергаться фиксации. Фиксация – метод обработки ткани с целью закрепления ее прижизненной структуры. Это достигается путем воздействия на ткань специальных растворов (фиксаторов). Наиболее существенным изменением, происходящим в тканях под воздействием фиксатора является процесс свертывания (коагуляции) белков. Количество фиксатора следует брать в 20-100 раз больше объема кусочка фиксируемого материала.Существуют фиксаторы простые и сложные. К простым относятся 10-20% раствор формалина, 96 º спирт, 100 (абсолютный) спирт, 1-2% раствор осмиевой кислоты и др. Сложные фиксаторы: спирт – формол (спирт 70º — 100 мл. и формалин 2-5 мл.) жидкость Ценкера (сулема – 5 г, сернокислый натрий — 1 г., двухромовокиолый калий – 2,5 г, дистиллированная вода – 100 мл., ледяная уксусная кислота 5 мл.) и др. Продолжительность фиксации – от нескольких часов до 1 суток и более в зависимости от свойств фиксатора и характера исследуемого материала. **3.Помывка в воде.**После фиксации материал промывают (чаще всего  в течение нескольких часов в проточной воде) с тем, чтобы избавить его от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей.Изучить с помощью микроскопа такие фиксированные кусочки органов невозможно, т.к. они не прозрачны. Чтобы кусочек органа можно было микроскопировать, его надо разрезать на очень тонкие пластинки – срезы, толщина которых измеряется в микрометрах. Такие срезы получают с помощью специальных приборов – микротомов. Но для того, чтобы резать на микротоме кусочек ткани, ее надо предварительно уплотнить. Это достигается путем  пропитывания застывающими жидкостями – расплавленным парафином. Парафин в воде не растворяется, и поэтому промытый после фиксации кусочек ткани необходимо предварительно обезводить,  и только затем пропитывать. **4. Обезвоживание.**Обезвоживание ткани производятся постепенно (чтобы не произошло сморщивания) путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50º, 60º, 70º, 80º, 90º, 96º, 100º.  В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка. **5.Уплотнение (заливка).**При заливке кусочки предварительно пропитываются теми жидкостями, которые служат растворителями для парафина (ксилол или толуол). Заливка в парафин. При заливке в парафин кусочки из абсолютного спиртапереносятся в смесь абсолютного спирта с хлороформом или ксилолом, взятых поровну, затем чистый ксилол и, наконец, в расплавленный насыщенный раствор парафина в хлороформе, где они находятся в термостате при температуре 37º  до 1 суток и более. Дальнейшая  заливка проводится в термостате при температуре 54º -56º в трех порциях парафина.Окончательная заливка проводится в парафин с добавлением воска, который наливают в специальные бумажные коробочки или стеклянные чашки, а затем эти коробочки или чашки после появления на поверхности парафина пленки, погружают в воду.Происходит полное затвердение парафина. Кусочки с окружающим их парафином извлекают из коробочек и с помощью расплавленного парафина, наклеивают на деревянные кубики, получаются парафиновые блоки.Уплотнения также можно добиться  замораживанием кусочка органа (срочная биопсия). **6. Приготовление срезов.**Срезы с блоков изготовляются на микротоме. Наиболее распространены микротомы санный и замораживающий. В специальных устройствах микротома зажимается парафиновый блок и микротомный нож. Существует механизм, поднимающий объектодержатель с блоком на заданное количество микрометров. Это позволяет при каждом скольжении ножа в плоскости параллельной поверхности блока получать срезы толщиной 5-10 микрометров с парафиновых блоков. **7. Окрашивание.**Изготовленные на микротоме срезы окрашиваются. Перед окраской из парафиновых срезов обязательно удаляют парафин (растворением в ксилоле).Окрашивание необходимо производить для  того, чтобы отчетливо выявить под микроскопом тонкие структуры объекта. В неокрашенных срезах большинство структур одинаково преломляет свет, поэтому рассмотреть их не удается.Выявление на срезе гистологических структур основано на неодинаковом их отношении к красителям. Одни структуры среза вступают в реакцию с кислыми  красителями и ими окрашиваются (ацидофильные, оксифильные структуры),  другие реагируют с основными красителями и окрашиваются преимущественно  ими (базофильные структуры). Некоторые структуры окрашиваются и кислыми и основными красителями.По происхождению различают краски естественные, к которым относятся краски растительного и животного происхождения, и краски искусственные. Краской растительного происхождения является гематоксилин, который добывается из кампешевого  дерева, растущего в Америке и  в Армении. К краскам животного происхождения относится кармин, который добывается из насекомых кошенили, живущих на кактусовых деревьях в Мексике, Армении и др. В  настоящее время большинство красок готовят синтетически(искусственные  краски).По окрашиванию определенных гистологических структур различают краски ядерные (окрашивание ядра), цитоплазматические  (окрашивающие цитоплазму), и специальные, окрашивающие избирательно определенные структуры.Ядерные краски – гематоксилин, кармин, сафранин, метиленовая синь, азур, тионин. Цитоплазматические краски – эозин, пикрофуксин.Существуют специальные краски и реактивы: судан Ш (окрашивает жир в  оранжевый цвет), осмиевая кислота (импрегнируемый ею жир окрашиватся в черный цвет), резорцинфуксин Вейгерта (дает темно-синюю окраску эластических волокон), орсеин (окрашивает эластические волокна в бурый цвет). Метиленовый синий окрашивает нервные элементы в синий цвет, а при импрегнации серебром они приобретают коричневый цвет.Чаще всего для окрашивания гистологических срезов применяется окрашивание  раствором гематоксилина (приготовленным по методу Бемера) и 1-2%  эозином.**8. Заключение среза.**Окрашенные и промытые в воде срезы во избежание помутнения обезвоживают в спиртах (70º, 96º),  просветляют в карбол-ксилоле, ксилоле, а затем  на предметное стекло, где находится срез, помещают каплю бальзама  и срез накрывают покровным стеклом. Бальзам представляет собой  растворенную в ксилоле смолу одного из видов сосны, растущей в Канаде (канадский бальзам),  смолу пихты (сибирский бальзам) или специальную синтетическую среду.При исследовании биопсий с целью уточнения диагноза в гистологических лабораториях прибегают к ускоренной обработке материала. Кусочки тканей и органов при этом проходят те же этапы обработки, но за 5-7 дней. Иногда производится так называемая срочная биопсия, когда в течение 15-80 мин. материал фиксирует, получают срезы, окрашивают их и заключают. Быструю фиксацию производят в 10% формалине, подогреваемом пламенем горелки или с использованием СВЧ-печи. Уплотнения добиваются замораживанием (хлорэтилом, углекислотой или с помощью замораживающего микротома). |
| **Примерная схема окраски препаратов гематоксилин — эозином**1. Парафиновые или замороженные срезы доводят до воды.2. Окраска гематоксилином — в течении  3-5 минут.3. Промывка в воде – 2 минуты.4. Дифференцировка в спирте, подкисленном соляной кислотой (1% раствор соляной кислоты в 70 % спирте), несколько секунд с последующим восстановлением подщелоченной водой (около 1 минуты). Этот этап желателен, но не обязателен.5. Промывка в проточной воде.6. Ополаскивание дистиллированной водой.7. Окраска 1 % эозином – 1-2 минуты.8. Ополаскивание дистиллированной водой.9. Обезвоживание в спирте – 2мин.10. Просветление в ксилоле – 2 мин11. Заключение среза – капля бальзама, покровное стекло. |

 **-приготовление цитологических препаратов**

**Методика приготовления мазка.**

Необходимой предпосылкой для точной оценки морфологических особенностей клеток в мазке является правильно сделанный, качественно фиксированный, хорошо окрашенный и методологически корректно изученный мазок, поступающий в лабораторию в сопровождении необходимых клинико-инструментальных и анамнестических данных. Невыполнение этих условий ведет к неправильному распределению клеток ткани, неполному выявлению их морфологических особенностей, "пропуску" важной диагностической информации на предметном стекле или отсутствию корригирующей клинической информации и, тем самым, к ошибочной оценке цитологической картины, а значит к неполноценному или ошибочному диагнозу. Если мазки были приготовлены вне лаборатории, то в соответствии с теми же требованиями оценивается их макроскопический вид. Сотрудники лаборатории должны постоянно обучать представителей клинических отделений, участвующих в приготовлении мазков.

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

1. Мазок должен начинаться на 1 см от узкого края предметного стекла и заканчиваться примерно в 1.5 см от другого края предметного; мазок не должен достигать длинного края стекла, между мазком и краем предметного стекла должно оставаться расстояние примерно 0.3 см.

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

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

4. Клетки в мазке должны быть равномерно распределены, все участки мазка должны хорошо просматриваться и не содержать "толстые участки", содержащие непросматриваемые (плохо просматриваемые) скопления или комплексы клеток.

**Правила фиксации мазка.**

Фиксация мазка проводится в соответствии с методикой, обусловленной биологическим материалом, взятым для цитологического исследования (влажная фиксация биологического материала или подсушивание его на воздухе). При влажной фиксации приготовленный мазок помещается в фиксирующую жидкость, затем подсушивается на воздухе. Недостаточная фиксация мазка ведет к некачественному окрашиванию клеток.

1. Правильная фиксация мазка обусловливает стойкость клеток по отношению к содержащейся в красках воде, которая в нефиксированном мазке изменяет строение клеточных элементов. При фиксации мазка происходит коагуляция белка, в результате чего клетки прикрепляются к предметному стеклу;

2. При фиксации цитологических препаратов должны использоваться фиксаторы, прописи приготовления которых приводятся в соответствующих руководствах.

3. Рекомендуемые фиксаторы: - метиловый спирт; - этиловый спирт; - смесь Никифорова; - фиксатор Май-Грюнвальда; - фиксатор Лейшмана; - ацетон (для иммуноцитохимии). Лучшим фиксатором является метиловый спирт, на основе которого готовят фиксатор Лейшмана и Май-Грюнвальда.

**Правила окрашивания мазка.**

Качественное окрашивание позволяет правильно идентифицировать клеточные элементы мазка и оценить их особенности при микроскопии. В адекватно окрашенном мазке структуры цитоплазмы, ядра, ядерного хроматина, ядрышек окрашены селективно.

1. При применении любой методики окрашивания мазка важно точно соблюдать последовательность процедур приготовления растворов и временные промежутки в течение процесса окрашивания.

2. Существующие в продаже партии красителя имеют различную интенсивность окраски. Это обязывает опытным путем установить оптимальные концентрации (разведение) и время окрашивания для каждого флакона красителя, которые устанавливают при окрашивании серии препаратов растворами с различной концентрацией красителя, меняя длительность его воздействия. При приготовлении растворов необходимо учитывать рН воды: она должна быть нейтральной (pH 6,8 -7,2), что обеспечивается использованием буферных растворов.

3. Рекомендуемые методы окрашивание цитологических мазков: - азур-эозиновый, (по Романовскому, Лейшману, Май-Грюнвальду, Панпенгейму и др.); - гематоксилиновый; - гематоксилин-эозиновый; - метод Папаниколау.

4. Для уточнения диагноза рекомендуется использование цитохимических и иммуноцитохимических методов анализа в соответствии с принятыми методиками.

**Приготовление стекол**

Стекла для приготовления цитологических препаратов должны быть чистые, обезжиренные и сухие.

1. Стекла тщательно промывают щеткой в теплой мыльной (или с моющим средством) воде.

2. Основательно промывают в проточной теплой воде.

3. Затем кипятят 1-2 часа в воде с добавлением соды (2-3%) или моющего средства.

4. После хорошо ополаскивают в чистой горячей воде и промывают в проточной (1-2 часа).

Обработанные и промытые в воде стекла протирают мягкой тряпкой, держа стекла за края, и хранят в смеси Никифорова (равные части 96° спирта и эфира). По мере надобности пинцетом извлекают стекла из смеси Никифорова и протирают сухой тряпкой. Обработанные таким образом стекла могут быть использованы для приготовления цитологических препаратов.

Для проведения цитохимических исследований очень хорошие результаты дает обработка предметных стекол и других стеклянных предметов в хромовой смеси следующего состава:

Двухромовокислый калий (бихромат калия) - 100 г; вода горячая - 1000 мл; неочищенная серная кислота - 100 мл.

Для приготовления хромовой смеси растворяют в горячей воде двухромовокислый калий, затем охлаждают раствор и после этого добавляют серную кислоту. Кислоту льют осторожно (обязательно в вытяжном шкафу), при этом смесь весьма сильно нагревается и приобретает темно-коричневый цвет. В этом составе предметные стекла и другую стеклянную посуду выдерживают 2-3 дня, а после промывают в проточной воде в течение 1-2 часов.

На хорошо обезжиренном предметном стекле вода должна растекаться тонким слоем, а не собираться в капли.

Для обеспечения надежной маркировки стекол используют механический и химический способы «матирования» края поверхности стекла. Механический способ основан на обработке предметного стекла абразивным камнем на станке. При использовании второго способа в пластмассовый сосуд вместимостью около 300 мл помещают 50 г фторида аммония и 50 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь тщательно перемешивают до кашицеобразной консистенции (в вытяжном шкафу). Высота слоя смеси в сосуде не должна превышать 1,5 см. Чистые предметные стекла устанавливают вдоль стенок сосуда таким образом, чтобы один конец стекла был погружен в смесь. В сосуде последовательно размещают 20 - 25 предметных стекол. Через 1 мин стекла переносят на 10-15 мин в пластмассовое ведро с большим количеством воды. Затем воду сливают и стекла обрабатывают слабым раствором серной кислоты (5 мл концентрированной кислоты на 8-10 л воды) для их обезжиривания. После этого стекла тщательно промывают водой и просушивают (можно с помощью вентилятора). Всю работу по подготовке предметных стёкол выполняют в резиновых перчатках. Смесь фторида аммония и концентрированной соляной кислоты можно использовать многократно, добавляя небольшое количество кислоты. Маркировать стекла можно также, подписывая один край стекла тушью.
Тест.

1.1 2.1 3.4 4.1 5.1 6.1 7.1 8.1 9.1 10.4 11.3 12.1,2,3,4 13.1,2 14.1 15.1

**5 день**

**Задание:**

**- уплотнение материала;**

**- обезвоживание.**

**Уплотнение материала.**

С помощью микроскопа можно изучать только прозрачные срезы, следовательно, они должны быть тонкими (толщиной в сотые или тысячные доли миллиметра). Существуют специальные аппараты — микротомы, позволяющие разрезать материал на пластинки требуемой толщины, но для этого необходимо предварительно кусочек уплотнить. Это делают путем замораживания и резки на замораживающем микротоме или пропитыванием застывающими жидкостями (например, подогретым парафином) и последующей резки на обычном микротоме. После фиксации кусочки промывают, обезвоживают, заливают в парафин и затем режут. Промывка позволяет очистить материал от фиксатора. После фиксации в формалине, хромовых и сулемовых жидкостях материал промывают в проточной воде в течение 1—2 суток. После фиксации в смеси с пикриновой кислотой для промывки используют 70% спирт. От качества обезвоживания зависит качество заливки. Обезвоживание проводят в "батарее" со спиртами, крепость которых постепенно повышается. Обезвоживание ткани производятся постепенно (чтобы не произошло сморщивания) путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50°, 60\*, 70°, 80°, 90°, 96°, 100°: В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка. Спирты разной концентрации готовят по прилагаемой таблице .

На практике можно пользоваться упрощенным расчетом: брать

количество спирта в миллилитрах, равное крепости требуемого рабочего

спирта, и к нему доливать столько воды, чтобы их сумма соответствовала

цифре крепости исходного спирта. Например, исходный спирт 96%. Для

получения 60% спирта следует к 60 мл исходного спирта долить 36 мл воды.

Исходным материалом для получения абсолютного (100%) спирта служит

96% этиловый спирт. Отнятие воды проводят с помощью извести (СаСОз)

или обезвоженного медного купороса. Медный купорос (меди сульфат)

удерживает 5 молекул кристаллизованной воды. Химически чистый медный

купорос прокаливают в стеклянной или фарфоровой посуде, помешивая

стеклянной палочкой до получения белого порошка безводной соли. **Для**

**обезвоживания** 100 мл спирта, налитого в банку с притертой пробкой, туда

помещают 10 г обезвоженного медного купороса. В течение 1 — 2 дней

банку часто встряхивают. Купорос приобретает голубой цвет. Тогда спирт

сливают в новую банку, куда насыпают белый порошок купороса, и

продолжают его встряхивать. Если купорос слегка посинеет, то спирт

сливают в третью банку с белым купоросом. Если после встряхивания

купорос перестанет синеть, абсолютный спирт аккуратно сливают или

фильтруют в чистую сухую бутылку и закрывают резиновой пробкой. С

помощью свежепрокаленной извести спирт можно обезводить быстрее. Для

этого его кипятят с негашеной известью 1—2 ч на водяной бане.

 Обезвоживание проводят в чисто вымытых и высушенных банках или

бутылках с притертыми пробками. Для получения качественных препаратов

его необходимо проводить постепенно. Нельзя сразу после промывки водой

помещать кусочки в 96% спирт. Если же фиксацию или промывку проводили

спиртом, то обезвоживание начинают со спирта более высокой

концентрации. Материал последовательно переносят в спирт более крепкий.

Время нахождения материала в спиртах зависит от размеров кусочков и

характера ткани (1—2 ч для маленьких объектов, 1—2 суток для кусочков

толщиной 2 см). Обычно его выдерживают в каждом спирту не менее 24 ч.

При переносе кусочков в более крепкий спирт их просушивают

фильтровальной бумагой. Спирты быстро загрязняются веществами, которые

извлекаются из материала, особенно жиром. Их нужно проверять, смешивая

с водой. Если при этом появляется белая густая муть — спирты подлежат

замене.

Тесты.

16.1 17.1 18.1 19.1 20.4 21.1 22.1 23.1 24.1 25.1 26.2

**6 день.**

**Задание:**

**- фиксация.**

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение, прекращает аутолиз, стабилизирует локализацию структур. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов. Для достижения этой цели возможны 3 подхода:

1. Высушивание

2. Замораживание

3. Химическая фиксация:

· Альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид)

· хромовая кислота

· тетраоксид осмия

· спирты (этанол, метанол)

· ацетон

· соли ртути (сулема)

· кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, азотная

**ПРОСТЫЕ ФИКСИРУЮЩИЕ ЖИДКОСТИ**

Химическая фиксация:

· альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид)

· хромовая кислота

· тетраоксид осмия

· спирты (этанол, метанол)

· ацетон

· соли ртути (сулема)

· кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, азотная)

**1. Альдегиды**

Можно хранить месяцами, надо всего лишь контролировать рН.

Формалин. Основным, широко применяемым фиксатором служит формалин, представляющий собой 40% раствор формальдегида. Формальдегид – это газ, растворимый в воде до концентрации40% по массе, каким он и поступает в продажу под названием «Формалин». В гистологической практике используют 10% раствор формалина, что соответствует 4% формальдегиду.Из формальдегида готовят нейтральный (забуференный до рН 7,0) 10—12% формалин. Для этого в банку с 40% формалином засыпают карбонат кальция или магния либо смесь этих солей — доломит из расчета 100 г на 1 л формалина. Для получения 10 % нейтрального формалина через 24 ч к 1 части 40% нейтрального формалина добавляют 9 частей водопроводной воды. Продолжительность фиксации 24—48 ч при 20°С

В водных незабуференных растворах Ф-д со временем превращается в муравьиную кислоту, метиловый спирт и ацетон, которые ухудшают качество фиксации, как и выпадение белого осадка параформальдегида. В результате точную Со Ф-да в растворах формалина установить не представляется возможным. Если на дне банки с 40 % формалином образовался осадок белого цвета (параформальдегид), то его можно растворить, подогрев до 70—80° С (в вытяжном шкафу!), и использовать для фиксации. Очищенный коммерческий параформальдегид применяют как составную часть многих фиксаторов для гистохимических и электронно-микроскопических исследований.

Фиксатор может показывать себя не с лучшей стороны из-за примесей, в основном метанола(до16%).Для этого существуют методы приготовления свободного от метанола

**4% ф-д по Гайеру**

 2гр параформальдегида + 50мл 0,1М фосфатного буфера(рН 7,4-7,6)=нагревают до 70с до просветления раствора, помешивают, охлаждают и фильтруют. Его рН 7,3-7,5.

**40% ф-д по Глауерт**

 готовят 40% параформальдегид(40гр порошка формальдегида + 100мл дистиллированной воды при нагревании до 65С, перемешивая

+ несколько капель 40%гидроксида натрия до просветления раствора.

**Солевой формол.**

· Нейтральный 40% формалин 100 мл

· Хлорид натрия 8,5 г

· Водопроводная вода 900 мл

Продолжительность фиксации 48 ч при 20 ° С с последующей промывкой в проточной воде в течение 6—12 ч.

Универсальным фиксатором, пригодным для гистологических и большинства гистохимических исследований, является нейтральный формалин по Лилли).

1. А. 100 мл 40 % формалина + 900 мл дистиллированной воды.

2. Б. 4 г дигидроортофосфата натрия моногидрата (однозамещенного фосфата натрия).

3. В. 6,5 г гидроортофосфата натрия (двузамещенного фосфата натрия).

**Фиксатор Лилли для кислых гликозаминогликанов**

1. Нитрат свинца 8гр

2. 40% раствор формальдегида 10мл

3. вода 10мл

4. этанол 80мл

продолжительность фиксации 24 часа при комнатной Т( при 4С – 2-3дня, 10-14 дней при –25С).

**Фиксатор Жандра для гликогена**

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

2. Раствор формальдегида 40% 10 частей

3. Ледяная уксусная кислота 5 частей

**Глутаровый альдегид для ферментов.**

Обеспечивает наибольшую сохранность ферментов.

· 0,2М фосфатный или какодилатный буфер(рН 7,2-7,4) 50л

· ДВ 40мл

· 25%глутаровый альдегид 10мл

· сахароза 8,5гр

**2.Тетраоксид осмия.**

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

· 2% ТО в ДВ 5мл

· натрия хлорид 850мг

· 0,2М фосфатный буфер 5мл

Для вторичной используют сахарозу вместо натрия.

**Раствор Флеминга**

· 2% ТО на дв 2мл

· 1% раствор хромовой кислоты на дв 7,5мл

· ледяная уксусная кислота 0,5мл (смешивать перед использованием)

**3.Хромовая кислота.**

Для стабилизации липидов, для фиксации гликогена и нуклеиновых кислот. **Фиксатор Элфтмана (бихроматсулема)**

· Сулема 5 гр.

· Бихромат калия 2,5 гр.

· ДВ 100мл

Продолжительность фиксации 3 дня.

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

 Его применяют для осаждения белков, в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку. Продолжительность фиксации от 2ч до 1 суток. Увеличение длительности фиксации, особенно в 100 % спирте1, нежелательно, так как материал значительно уплотняется и происходит его пересушивание. Оптимальная температура для фиксации материала в спирте +4 °С, но ее можно проводить и при комнатной температуре. Если после спиртовой фиксации предстоит резать ткань на замораживающем микротоме или криостате, то кусочки промывают в течение 1 —2 ч до их полного погружения на дно банки, при этом происходит насыщение ткани водой.

**5.Уранилацетат**

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

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

**6.Кислоты**.

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

**Фиксатор Жандра для гликогена**

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

5. Раствор формальдегида 40% 10 частей

6. Ледяная уксусная кислота 5 частей

**Жидкость Буэна** классический фиксатор для экспериментальных исследований.

· Насыщенный раствор пикриновой кислоты 75 мл

· Нейтральный 40 % формалин 25 мл

· Ледяная уксусная кислота 5 мл

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

**Жидкость Карнуа**

универсальный фиксатор для большинства гистологических и гистохимических исследований (кроме выявления липидов). Наилучший для кожи, для предупреждения пересушивания в качестве промежуточной среды используют хлороформ.

· Спирт 100 % или 96 % 60 мл

· Хлороформ 30 мл

· Ледяная уксусная кислота 10 мл

Продолжительность фиксации 2—4 ч при 4 ° С или 1—2 при 20 °С. Затем материал помещают в 100 % спирт. Если материал не сразу подлежит проводке, то его можно перенести 96 % спирт и держать в нем до 3 суток.

Сюда также входят фиксирующие смеси по Боуену, Жандру, Карнуа, Лилли, Ценкеру, Бродскому, прочее.

**7.Сулема (дихлорид ртути).**

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

**СЛОЖНЫЕ ФИКСАТОРЫ**

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

**Спирт-формол по Шаферу.**

· 10 % нейтральный формалин, который готовят из 1 части нейтрального 40 % формалина и

· 2—3 частей 96 % спирта.

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

**Кальций-формол по Бейкеру** (Проверено) используют для фиксации липидов.

· 10 мл 40% формалина + 90 мл дистиллированной воды.

· 1 г хлорида кальция.

Растворы смешивают.

Продолжительность фиксации 24—48 ч при 20°С.

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

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

· 10 г хлорида кальция + 500 мл дистиллированной воды.

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

Продолжительность фиксации 24—48 ч при 20°С.

Используется также **фиксатор Карнуа**, в состав которого входят

· 75 мл 100 % спирта

· 25 мл ледяной уксусной кислоты

Условия фиксации те же. В случае отсутствия этилового спирта вместо жидкости Карнуа можно использовать смесь следующего состава:

· Изопропиловый спирт 60мл

· Пропионовая кислота 30м

· Ацетон 10мл

· Диоксан 10мл

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

**Жидкость Ценкера — сулемовая смесь**.

· Бихромат калия 2,5г

· Сульфат натрия 1 г

· Дистиллированная вод100мл(это-жидкость Мюллера).

· Сулема 5г

· Ледяная уксусная кислота 5мл

Ледяную уксусную кислоту можно заменить нейтральным 10 % формалином (фиксатор Максимова, ценкер-формол). Продолжительность фиксации 1—24 ч при 20°С. После фиксации материал в течение 12—24 ч отмывают в проточной воде и помещают в йодированный 70% спирт для удаления остатков сулемы. При добавлении 10 мл 2 % раствора тетраоксида осмия хорошо фиксируются и окрашиваются липиды.

В последнее время для гистологических исследований часто применяют глутаровый альдегид, параформальдегид, фиксаторы Ито, Замбони и др., особенно в тех случаях, когда материал предназначается одновременно для нескольких видов исследования (иммуноморфологического, электронно-микроскопического), а его количество ограничено, например, при пункционных биопсиях.

**ПРАВИЛА РАБОТЫ С ФИКСАТОРАМИ**

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

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

Тест.

27.1 28.1 29.1 30.1 31.1 32.1 33.1 34. 1 35.1 36.1 37.1 38.1

**7 день**

**Задание:**

**- техника окрашивания срезов:**

Окраска гистологических срезов основана на неодинаковом сродстве тканевых элементов к определенным красителям. Ядра клеток более способны окрашиваться основными, а цитоплазма - кислыми красками. Соответственно этому различают основные, или ядерные, и кислые, или диффузные, краски.

Наиболее часто в обычной патологоанатомической практике применяются окраски срезов гематоксилин-эозином по Ван-Гизону, Перлсу, Суданом III и др.

Окраска гематоксилин-эозином. Окрашивают срезы в маленьких чашках Петри или на стеклах. Этот метод применяется для окраски срезов, приготовленных любым способом. При этом ядра клеток приобретают фиолетово-синий или густо-синий цвет, а цитоплазма и волокнистое вещество - светло-синий или розово-красный. Жиры и липоиды не окрашиваются. Эритроциты млекопитающих, поскольку они ядер не содержат, окрашиваются только эозином.

Окраску срезов в чашках Петри производят следующим образом.

1. Срез переносят препаровальной иглой из воды в раствор гематоксилина на 2-5 мин.

2. Промывают в воде 2-5 мин.

3. Погружают на 10-20 с в 1%-ный раствор соляной кислоты на 70° спирте (если срез сильно перекрашен гематоксилином, его следует держать в этом растворе несколько дольше).

4. Промывают в чистой воде 5-10 мин.

5. Промывают в слабощелочном растворе (в баночку с водой прибавляют 1-2 капли нашатырного спирта) 10 мин.

6. Промывают снова чистой водой в течение 10 - 15 мин. Если срез после щелочной воды недостаточно промыт, он плохо опрашивается эозином.

7. Окрашивают эозином в течение 3-5 мин.

8. Промывают в течение 1-2 мин водой. 280

9. Обезвоживают в спиртах восходящей крепости - 75, 90, 100°. Если срез перекрашен эозином, его следует несколько дольше держать в 75° спирте.

10. Просветляют в карболксилоле.

11. При помощи шпателя и иголки срез переносят на предметное стекло.

12. Высушивают фильтровальной бумагой.

13. На срез наносят каплю канадского или пихтового бальзама и накрывают покровным стеклом.

Окраска по Ван-Гизону. В срезах, окрашенных по Ван-Гизону, соединительная ткань красится в ярко-красный, остальные ткани - в желтый или серовато-желтый цвет. Ядра окрашиваются в черный или тёмно-фиолетовый цвет.

Окраску производят следующим образом.

1. Срезы интенсивно окрашивают гематоксилином (лучше гематоксилин Вейгерта) и споласкивают в воде.

2. Сразу переносят в пикрофуксин на 3-5 мин (смесь насыщенного водного раствора пикриновой кислоты - 150,0 и насыщенного водного раствора кислого фуксина -3,0-5,0).

3. Быстро промывают в воде (вода извлекает из среза фуксин).

4. Обезвоживают 95° спиртом 1-2 мин.

5. Просветляют в карболксилоле и заключают в пихтовый бальзам, как при окраске гематоксилин-эозином.

**Окраска Суданом III**. Судан III - нейтральная азокраска, растворимая в спирте, ацетоне и жирах, не растворимая в воде. Окраску Суданом III производят для определения в срезах жиров и липидов. Техника окраски следующая.

1. Замороженные срезы переносят изводы на 0,5- 1 мин в 50° спирт.

2. Срезы помещают в свежефильтрованный раствор Судана на 10-20 мин.

3. Споласкивают 50° спиртом в течение 0,5-1 мин.

4. Тщательно промывают водой в течение 10 - 15 мин.

5. Срезы подкрашивают квасцовым гематоксилином Эрлиха или Бемера.

6. Промывают водой в течение 3-5 мин. Перекрашенные в гематоксилине срезы дифференцируют в 1%-ном водном растворе соляной кислоты, споласкивают подщелоченной водой, затем чистой водой.

7. Заключают в глицерин или глицерин-желатину.

- предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской.

8. Накрывают покровным стеклом.

**Приготовление парафиновых срезов.** Блок фиксируют в

объектодержателе так, чтобы длинная ось блока располагалась вдоль

длинной оси микротома, а поверхность блока горизонтальной. Очень важна

правильная установка ножа. Оптимальным углом наклона ножа считается

такой, когда плоскость фасетки совпадает с плоскостью среза. На практике

угол наклона ножа обычно несколько больше оптимального. Если угол

наклона ножа слишком велик, материал будет крошиться, если слишком мал,

нож будет 1 – 2 раза проскальзывать над блоком, а потом срезать толстый

срез.

 Парафиновые блоки режут прямым ножом. При резке парафиновых блоков

нож устанавливают перпендикулярно оси микротома или слегка под углом. В

последнем случае нельзя получить серийных срезов, но зато очень плотные и

трудно режущиеся объекты режется легче.

Когда нож установлен, к нему осторожно подводят блокодержатель с блоком

и одновременно придвигают нож к блоку. Подачу объектодержателя

осуществляют с помощью кремальеры, расположенной в основании

объектодержателя, либо рукой, толкая санки объектодержателя вдоль

наклонных рельсов. Когда блок и нож сближены, проверяют

горизонтальность верхней поверхности блока, которая не должна доходить

до лезвия ножа на 0,5-1 мм. После этого устанавливают микрометрическую

шкалу на получение толстых срезов (30 мкм) и движением салазок ножа

начинают подавать блок вверх до тех пор, пока не начинают получаться

первые полные срезы, затем микрометрическую шкалу следует установить на

необходимую толщину срезов. Парафиновые срезы делаю толщиной 7-10

мкм. При очень хорошо залитом материале и хорошо наточенном ноже

можно получить срезы толщиной 3-5 мкм. Парафиновые срезы режут сухим

ножом.

Полученные парафиновые срезы осторожно, не прикасаясь к режущему краю

ножа, снимают влажной кисточкой или препаровальной иглой и помещают в

чашку с теплой водой или сразу наклеивают на предметное стекло. Если

блоки небольшие и прямоугольные, при поперечном положении ножа при

резке из срезов получают ленточки (серии). Отдельные срезы не снимают с

ножа. Края их прикреплены друг к другу, и они располагаются полоской друг

к другу. Эту полоску снимают целиком для дальнейшей обработки.

Парафиновые срезы всегда сморщены и имеют складки. Эти морщинки и

складки необходимо расправить, либо поместив срезы на поверхность теплой

(не горячей, чтобы не расплавился парафин!) дистиллированной воды, либо в

процесс наклеивания на предметное стекло.

Наклеивают парафиновые срезы на чистые обезжиренные предметные

стекла, смазанные белком с глицерином. Для приготовления последнего

свежий яичный белок взбивают шпателем и фильтруют через смоченный

дистиллированный водой бумажный фильтр. К профильтрованному белку

добавляют равный объем глицерина, смешивают и кладут для

предупреждения загнивания 2-3 кусочка тимола величиной с зернышко

пшеницы. В зарытой склянке белок с глицерином наносят на предметное

стекло и пальцем размывают тонким слоем по стеклу. Если срезы были

помещены в чашку с дистиллированной водой, белок на стекле коагулирует,

подержав стекло над спиртовкой белком вверх. Затем расплавленный срез

при помощи кисточки выливают из воды и переносят на стекло. Осторожно

наклоняя предметное стекло, дают воде стечь и затем на 12-24 ч стекло

переносят в термостат с температурой 37°C.

Более употребителен другой способ наклеивания и расплавления

парафиновых срезов. При этом на смазанное белком с глицерином

предметное стекло наносят несколько капель дистиллированной воды, на

которую прямо с миротомного ножа переносят срезы. Затем стекло

осторожно подогревают над спиртовкой до полного расправления срезов,

при этом следует избегать расплавления парафина, так как в противном

случае материал портится. Излишнюю воду осторожно удаляют

фильтровальной бумагой, и стекла оставляют для просушки при комнатной

температуре или в термостате при 37°C. Вместо спиртовки для расправления

парафиновых срезов можно использовать специальный электрический

прибор «Приспособление для сушки и расправления парафиновых срезов»,

представляющий собой подогреваемый до нужной температуры столик. На

покрытое белком стекло наносят несколько капель дистиллированной воды,

кладут стекла на столик и переносят на него срез. После расправления среза

лишнюю воду удаляют фильтровальной бумагой и оставляют стекло с

наклеенным срезом на столике для досушивания.

Правила резки парафиновых блоков и некоторые способы устранения

возможных недостатков заключается в следующем. Передвигать салазки

ножа нужно равномерно, не нажимая на них. Если материал крошиться, то

это можно зависеть от слишком большого наклона ножа или от слишком

тугоплавкого парафина и низкой температуры окружающей среды.

Правильный угол наклона можно найти эмпирически, попробовав разные

углы наклона. На влияние низкой температуры можно, подышав на блок или

пристроить настольную лампу таким образом, чтобы она светила на блок и

слегка его согревала.

Если залитый материал отделяется от парафина или выпадает из него,

причина может заключаться в недостаточном удалении из материала спирта

или в использовании при заливке слегка охлажденного парафина. В любом

случае материал нужно поместить обратно в промежуточную среду (ксилол,

хлороформ) и затем повторить заливку. Если срезы разрываются и

покрываются бороздками, это означает, что на ноже есть зазубрены. Можно

попробовать слегка подвинуть нож, так чтобы на блок приходился другой его

участок. Если это не поможет, необходимо точить нож заново.

Закручивание срезов и их прилипание к ножу встречаются при очень

мягком парафине и высокой температуре окружающей среды. В этом случае

пред резкой модно положить блок в холодильник, а во время резки время от

времени класть не него кусочек льда, завернутый в марлю.

Причиной того, что не каждый срез, а лишь каждый второй годен для

исследования, может быть неправильный угол наклона ножа. Возможно

также, что срезы слишком тонки на несколько микрометров увеличить

толщину среза.

Если блок плохо режется, нож подскакивает на поверхности блока и

толщина срезов неровная, это объясняется чрезмерным уплотнением

материала при фиксации. Исправить этот недостаток нельзя, но можно

попробовать подышать на блок и поставить микротомный нож не

перпендикулярно, а под углом. Серии срезов при этом получить нельзя, но

отдельные срезы режутся лучше.

В сухую погоду срезы электризуются и сильно прилипают к ножу. Это

можно предотвратить, подышав на нож перед резанием.

Маркировка стекол обычно следует за резанием блоков. Для этого при

наклеивании срезов на блок один конец стекла оставляют свободным.

Надпись на стекло можно наносить с помощью алмазного отметчика, но

чаще это делается тушью. Так как тушь размазывается или стирается, следует

ее наносить на смазанный белком и высушенный конец стекла. Затем этот

конец нагревают над спиртовкой. Надпись при этом фиксируется и в

дальнейшем не стирается.

Тест.

39.1 40. 1 41. 1,2,3,4 42.1 43.1 44.1 45.4 46.1,2 47. 1 48.1 49.1

**8 день.**

Задание:

- предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской.

**ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА СРЕЗОВ К ОКРАШИВАНИЮ**

**Депарафинирование срезов**

Парафиновые или  срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя - бензола, толуола, ксилола, бензина. Особенно тщательно удаляют парафин перед исследованием ткани в поляризационном микроскопе, так как парафин обладает двоякопреломляющим свойством.

|  |
| --- |
| **Депарафинирование осуществляют по следующей схеме.:** |
| Ксилол 1 | 10-15 мин., можно в термостате при 37 С |
| Ксилол 2 | 3-5 мин. |
| Спирт 100% 1 | 1-2 мин |
| Спирт 100%-2 | ополоснуть |
| Спирт 96%-1 | ополоснуть |
| Спирт 96%-2 | ополоснуть |
| Дистиллированная вода | 2 смены |

После депарафинирования 100 150 препаратов реактивы нужно менять. 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 в коробки и окрашивают по мере необходимости.

**- устройство микроскопов и техника микроскопирования.**

**Устройство микроскопа и техника микроскопирования**

Для исследования дрожжей, бактерий и плесневых грибов применяют микроскопы, предназначенные для рассмотрения прозрачных препаратов в проходящем свете (рис. 8).

*
Рис. 8. Микроскоп МБИ-1: 1 - зеркало, 2 - конденсор, 3 - предметный столик, 4 - объективы, 5 - револьвер, 6 - окуляр, 7 - тубус, 8 - тубусодержатель, 9 - макрометрический винт, 10 - микрометрический винт, 11 - ножка*

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

Изображение, даваемое объективом, рассматривают с помощью окуляра, находящегося в верхней части тубуса микроскопа. Биологические микроскопы снабжаются тремя сменными окулярами. На верхней оправе линзы окуляра указано его увеличение. Обычно окуляры дают увеличение в 7, 10 и 15 раз. Общее увеличение объекта микроскопом равно произведению увеличения окуляра на увеличение объектива [10 (окуляр) × 90 (объектив)] = 900 раз.

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

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

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

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

**Техника приготовления препарата для микроскопирования.** Каплю исследуемой жидкости наносят на чистое предметное стекло и осторожно накрывают покровным стеклом. Если препарат готовят с плотной питательной среды, то на предметное стекло наносят капельку чистой водопроводной воды, в нее помещают исследуемую культуру и препарат накрывают покровным стеклом. Под последним не должно оставаться пузырьков воздуха, так как они мешают микроскопированию. Избыток жидкости, выступающий из-за покровного стекла, убирают фильтровальной бумагой, заранее нарезанной небольшими узкими полосками. Готовый препарат помещают на предметный столик и исследуют.

Тест.

49

**9 день.**

**Задание:**

**- проведение окрашивания срезов, наклеенных на предметные стекла и свободноплавающих срезов.**

Окрашивание срезов, наклеенных на стекло, проводят путем помещения их в красящий раствор. Для этого специальные кюветы, позволяющие красить одновременно большое количество стекол, проводят по схеме в высоких стаканчиках с краской.

Для того чтобы окрашенный препарат можно было исследовать в проходящем свете и дольше хранить, он должен быть прозрачным и защищен от высыхания, загрязнения и повреждения.

**- просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы) .**

Просветление делает препараты прозрачными, проходимыми для лучей света и потому удобными для исследования. Различают две группы просветляющих веществ в зависимости от того, способны ли они просветлять срезы после извлечения их из воды или только после обезвоживания спиртом.

Первую группу веществ, т. е. просветляющих срезы после воды, составляет глицерин, глицерин-желатина и т. д. и ряд сложных специально приготовленных сред, как то: фаррактова жидкость, масса Апатии. Подобные просветляющие вещества обычно употребляют при некоторых специальных методах исследования, например на липиды, амилоиды. В этом случае окрашенный срез извлекают из воды на предметное стекло, расправляют, удаляют избыток воды вокруг среза тряпкой, кладут каплю глицерина или другое просветляющее вещество из этой группы и покрывают покровным стеклом. Можно применять этот метод и для различных ориентировочных исследований.

Ко второй группе веществ (просветляющих срезы после спирта) относятся ксилол, толуол, эфирные масла, карболксилол, карболтолуол и т. д.

Для просветления срезов чаще всего пользуются веществами второй категории, так как они обладают более высоким просветляющим эффектом и дают прочные препараты. По этой последней причине срезы после окрашивания подвергают спиртовой обработке, то более, то менее тщательной смотря по тому, с каким просветляющим средством приходится работать.

Так, например, ксилол и толуол весьма чувствительны к качеству обезвоживания срезов и поэтому здесь показано применение абсолютного спирта. Креозот, эфирные масла, карболксилол в этом отношении менее чувствительны, они легко просветляют и после 960 спирта. Все просветляющие вещества обладают теми или иными неблагоприятными свойствами, проявляющимися иногда при длительном хранении препаратов. Один из них вызывает пожелтение препаратов (креозот), другие сильно морщат срезы (ксилол, толуол, карболксилол) и, наконец, почти все они, за исключением ксилола и толуола, в той или иной степени извлекают различные синтетические (анилиновые) красители и поэтому имеют ограничения.

На основании вышеизложенного, делаем вывод, что большим достоинством ксилола и толуола является их абсолютно индифферентность к любым красителям.

Просветленные и обработанные ксилолом срезы заключают в специальные срезы.

Для заключения гистологических срезов используют такие вещества, как канадский и пихтовый бальзамы, канифоль, гумми - сироп, глицерин и др. Одни из них являются веществами дефицитными, другие обладают существенными недостатками.

Применение пластических масс для заключения гистологических срезов позволяет отказаться от всех перечисленных выше веществ и от покровных стекол, т. к. пластмасса пропитывает срез и одновременно покрывает его тонким слоем сверху, заменяя тем самым покровное стекло.

**10 день.**

Задание:
**- обработка биопсийного материала;**

Прежде всего следует упомянуть о правильном иссечении кусочков из органов, которое производят острыми инструментами: скальпелем, лезвием бритвы, малыми глазными ножницами и др. Недопустимы деформация и механическое повреждение ткани, поэтому кусочки губчатой кости не следует откусывать кусачками, а рекомендуется использовать пилящие инструмен­ты. Если ткань компактна и структуры распределены в органе относительно равномерно, то кусочек вырезают из любого отдела вместе с капсулой (печень, селезенка, поджелудочная железа и др.). Кусочки из почек и надпочечников вырезают так, чтобы на срезе имелось и корковое, и мозговое вещество. Полые органы исследуют на поперечных сечениях, проходящих через все слои стенки. Если при макроскопическом исследовании в ткани обнаружены патологические изменения (опухоли, эрозии, инфильтраты), то кусочки обязательно иссекают на границе с нормальным участком ткани. Особенно важно место перехода нормальной ткани в опухолевую.

В том случае, если для исследования прислан достаточно крупный объект, его следует разрезать на пластины толщиной до 5 мм и изучать с помощью бинокулярной лупы или стереомикроскопа для ориентировочной дифференциации дисгормональных, диспластических процессов в железистых органах (сохранение дольчатости, наличие узлов, однородности, мелкозернистой структуры) и опухолей (фокусы уплотнения, «стекловидные» поля, сосочковые структуры, псаммомные тельца, очаги некроза, обызвествления). Кроме того, благодаря этому исследованию можно правильно сориентировать мелкие кусочки биоптатов на блоке.

Вырезанные кусочки ткани должны иметь размер не более 1,5х1х0,5 см, оптимальный для быстрой фиксации и проводки материала. В случае необходимости свежий материал можно промыть в изотоническом растворе хлорида натрия, а затем фиксировать. Промывание в воде нефиксированного материала недопустимо.

При эндоскопических и пункционных биопсиях желудка или прямой кишки, когда количество материала ограничено, следует разрезать цилиндрический кусочек на 2 части так, чтобы на срезе была слизистая оболочка и подслизистая основа. При биопсии почки кусочек надо ориентировать так, чтобы на срезе было корковое и мозговое вещество. Одну часть пунктата заливают в парафин для гистологических и гистохимических исследований, другую используют для электронно-микроскопического исследования и/или флуоресцентной микроскопии.

**- приготовление препаратов для электронно – микроскопического исследования.**

Для целей электронной микроскопии в этапах приготовления препаратов имеются некоторые особенности, но общие принципы те же. Главное отличие заключается в том, что гистологический препарат для световой микроскопии может длительно храниться и многократно использоваться. Срезы для электронной микроскопии используются однократно. При этом вначале интересующие объекты препарата фотографируются, а изучение структур производится уже на электроннограммах.

Из тканей жидкой консистенции (кровь, костный мозг и другие) изготавливаются препараты в виде мазка на предметном стекле, которые также фиксируются, окрашиваются, а затем изучаются.

Из ломких паренхиматозных органов (печень, почки и другие) изготавливаются препараты в виде отпечатка органа: после разлома или разрыва органа, к месту разлома органа прикладывается предметное стекло, на которое приклеиваются некоторые свободные клетки. Затем препарат фиксируется, окрашивается и изучается.

И наконец, из некоторых органов (брыжейка, мягкая мозговая оболочка) или из рыхлой волокнистой соединительной ткани изготавливаются пленочные препараты путем растягивания или раздавливания между двумя стеклами, также с последующей фиксацией, окраской, заливкой в смолы и дальнейшем изучении.

Способ подготовки препарата крови к электронно-микроскопическому исследованию осуществляется следующим образом.

В качестве примера приведено исследование эозинофилов периферической крови (ЭПК), выделенных от больных с аллергической реакцией. Часть исследуемых выделенных клеток эозинофилов подвергают предварительному воздействию лазерного излучения, часть исследуемых клеток остается интактной.

Данное исследование ставит перед собой задачу оценить изменения в клетке и внутриклеточных структурах, происходящие под воздействием лазерного излучения, в частности установить дозу лазерного излучения, вызывающую дегрануляцию эозинофилов, вызывающую у больного отеки, спазмы, явление агрегации тромбоцитов. Установление дозы лазерного излучения, вызывающей вышеуказанные изменения эозинофилов, позволит определить до начала лечения оптимальную не повреждающую дозу лазерного излучения для лечении больных с аллергической реакцией.

Забор осуществляют из периферической вены (10 мл) с гепарином, из расчета 500 ЕД гепарина на 10 мл крови. Выделение ЭПК осуществляют на непрерывном градиенте плотности фиколлаурографина (1,115 г/мл, 1,120 г/мл). Примесь других клеток составляет около 20%. После выделения 10 мкл взвеси выделенных ЭПК часть их наносят на предметное стекло, расположенное над водяной баней при 37°С, и облучают.

Для исследования изменений, происшедших в структуре эозинофилов, подвергнутых воздействию лазерного излучения и интактных клеток, готовят препараты тех и других клеток для электронно-микроскопического исследования, выполняя следующие переходы.

**11 день.**

**Задание:**

**- проведение микроскопического исследования цитологических и гистологических мазков.**

**Цитологический метод** позволяет выявлять различные патологии в развитии клеток. В основе исследования лежит тот же принцип, что и при гистологическом анализе биопсийного материала, — морфологический, но в данном случае требуется лишь совсем небольшое количество биоматериала. Цитологический препарат — мазок-отпечаток или соскоб — можно сделать в течение нескольких минут, не используя специальную аппаратуру. Также, в отличие от биопсии, анализ менее инвазивен.

Влагалищный мазок помогает исследовать нарушения гормональной функции яичников. А исследование мазков свода влагалища и шейки матки позволяет выявить онкологию на ранней стадии и предраковые состояния. Также с помощью исследования можно вовремя обнаружить рак легких, желудка, мочевого пузыря, предстательной железы и других органов. Более того, можно выявить гистологическую форму опухоли, определить распространенность злокачественного новообразования, распознать метастазы. Но не только рак становится «целью» цитологии: это еще и вирусные, и воспалительные, и аутоимунные патологии. С помощью цитологических исследований следят даже за скоростью заживления ран.

**Когда назначается цитологическое исследование**

Анализ назначает врач: терапевт, хирург, онколог, гинеколог и т.д. К показаниям для назначения цитологического исследования относятся:

подозрение на воспалительный процесс, раковое заболевание, вирусную инфекцию — для уточнения диагноза;подтверждение онкологического диагноза при хирургическом вмешательстве (удалении тканей);

отслеживание динамики лечения различных заболеваний;

контроль результатов терапии;

скрининг в профилактических мерах;

контроль за состоянием при вероятности рецидивов (обязательно — после излечения от онкологии).

Для анализа, как мы уже сказали, может использоваться различный биоматериал, в зависимости от исследуемого органа.

**Методы цитологического исследования**

В разных клиниках могут быть использованы различные способы цитологического анализа, но основными являются следующие:

**Световая микроскопия**

Как следует из названия, в основе метода — анализ с помощью оптического (светового) микроскопа. Образец исследования в данном случае должен быть прозрачен или полупрозрачен, чтобы световой луч мог пройти сквозь него. Самые современные оптические микроскопы способны давать увеличение до 3 000 раз, что позволяет исследовать образцы размером от 200 нанометров. Минус метода как раз в том, что клетки меньшего размера не поддаются анализу.

**Световая микроскопия** дает возможность не только рассмотрения общего плана клетки, но и процессов ее жизненного цикла — деления, перемещения цитоплазмы, движений клетки и т.д. Существует несколько видов оптической микроскопии: UV, люминесцентная, темного и светлого поля и другие. Такой метод подойдет для исследования различных штаммов заболеваний, опухолевых или измененных клеток. Точность оптической микроскопии приближается к 100%.

**Электронная микроскопия**

Конструкция электронного микроскопа сходна с конструкцией оптического, однако функцию линз здесь выполняют электромагниты, фокусирующие и направляющие «лучи» электронов на объект исследования. Затем «взаимодействие» образца и электронов выводится на экран или запечатлевается на специальной фотопленке.

На экране можно получить увеличение в 50 000 раз, а при фотопечати добиться десятикратного увеличения к уже имеющемуся. В итоге электронный микроскоп способен увеличивать в 500 000 раз. Разрешение электронного микроскопа в 106 раз выше разрешающей способности человеческого глаза! Впрочем, на биологических объектах максимального разрешения получить пока невозможно ввиду их недостаточной контрастности.

Чтобы образцы были более контрастными, их зачастую «протравливают» солями тяжелых металлов. После этого клеточные структуры приобретают разную степень поглощения электронов и выделяются на экране/пленке. Таким образом удается «вычислить» вирусы, рассмотреть строение клеточных мембран и другие микрообъекты, например рибосомы. Электронная микроскопия позволяет увидеть взаимодействие антител и антигена, что крайне важно для вирусологии. Метод делает возможным определение формы и размера вирусных частиц. Благодаря электронной микроскопии были идентифицированы вирус гепатита А и вирус гепатита Е. Сейчас ее используют для характеристики морфологически отличных от вируса антигенов или каких-либо ранее неизвестных вирусов. Применяется методика и в онкологии. Однако по последним данным функциональная морфология и иммуноцитохимия (считающаяся приоритетной) клеток не всегда совпадают, что рождает сомнения в надежности классификаций, основанных на морфологических признаках.

**Метод центрифугирования**

Данный метод применяется для детального исследования химического состава клеточных органелл. Для этого раздробленный в гомогенизаторе образец помещают в центрифугу и запускают вращение. Органеллы оседают слоями на дно центрифуги. Затем фракции разделяют на отдельные компоненты и изучают субклеточные структуры. Таким образом получают материал для цитохимического анализа. С помощью центрифугирования проводят один из самых известных и распространенных цитологических анализов — тест Папаниколау (ПАП-тест). Специфичность исследования — почти 100%.

**Метод меченых атомов**

Авторадиография позволяет наблюдать за биохимическими процессами внутри отдельных клеток. Для этого элементы углерода, кислорода и т.д. в клетках «подменяют» их радиоактивными изотопами и затем, с помощью специальных приборов фиксируют локализацию, передвижение и характер поведения изотопов.

**Метод рентгеноструктурного анализа** нужен для изучения пространственного расположения и свойств ДНК, РНК, белковых цепочек в составе клеточной структуры.

**Метод клеточных культур** заключается в выращивании клеток в условиях питательной среды и их последующем изучении.

**Микрохирургический метод** заключается в имплантировании или, наоборот, удалении из клетки каких-либо органелл, введении в клетку сторонних молекул или искусственном «обмене» органеллами между клетками.

**Методы исследования в гистологии**.

Подготовка препаратов к микроскопии. Методы исследования в гистологии включают приготовление гистологических препаратов и их изучение с помощью световых или электронных микроскопов. Гистологические препараты представляют собой мазки, отпечатки органов, пленочные препараты, тонкие срезы кусочков органов, окрашенные тем или иным красителем (исследуются также нативные — неокрашенные срезы), помещенные на предметное стекло, заключенные в бальзам и покрытые тонким покровным стеклом. Для изготовления **гистологического препарата** необходимо после взятия материала произвести его фиксацию в том или ином фиксаторе (формалине, спирте, а для электронной микроскопии — в глутаровом альдегиде и четырехокиси осмия). Делается это для предотвращения процессов аутолиза и сохранения структуры органа, близкой к прижизненной. Далее следуют этапы обезвоживания кусочка органа в спиртах возрастающей концентрации и в ксилоле с целью уплотнения тканей, что необходимо для изготовления тонких срезов. Для придания кусочку органа еще большей плотности и гомогенности, обеспечивающей высококачественную резку, проводят его заливку в органическую среду — парафин, целлоидин (для световой микроскопии) и органические смолы (эпон, аралдит, дуркупан) — для электронно-микроскопического исследования. Существуют также физические **способы фиксации** материала, наиболее распространенным из которых является быстрое замораживание кусочка органа с помощью жидко.го азота и других средств. Для резки замороженного материала используют специальные приборы — криостаты, или замораживающие микротомы. Толщина срезов, предназначенных для световой микроскопии, не должна превышать 4-5 мкм, для электронной — 50-60 нм (такие ультратонкие срезы изготавливают на специальном приборе ультратоме, используя стеклянные или алмазные ножи и автоматический режим резки). После получения срезов их помещают на предметные стекла, далее следуют этапы освобождения срезов от заливочной среды (при световой микроскопии) и окраски для придания срезам контрастности. Среди гистологических красителей наиболее часто употребляется сочетание гематоксилина, маркирующего ядро (кислотные молекулы), и эозина, избирательно окрашивающего белковые молекулы (цитоплазматический краситель). По окончании окрашивания срезы заключают в консервирующие среды (канадский, кедровый бальзамы) и накрываются покровным стеклом. **Основным методом гистологического исследования к**леток, тканей и органов является световая микроскопия. В световом микроскопе для освещения объекта используются лучи видимого спектра. Современные световые микроскопы позволяют получать разрешение порядка 0,2 мкм (разрешающая способность микроскопа — это то наименьшее расстояние, при котором две рядом расположенные точки видны как отдельные). Разновидности световой микроскопии — фазово-контрастная, интерференционная, поляризационная, темнопольная и др. **Фазово-контрастная микроскопия** — метод изучения клеток в световом микроскопе, снабженном фазово-контрастным устройством. Благодаря смещению фаз световых волн в микроскопе такой конструкции повышается контрастность структур исследуемого объекта, что позволяет изучать живые клетки. **Интерференционная микроскопия**. В интерференционном микроскопе падающие на объект световые пучки раздваиваются — один пучок проходит через объект, другой — идет мимо. При последующем воссоединении пучков возникает интерференционное изображение объекта. По сдвигу фаз одного пучка относительно другого можно судить о концентрациях различных веществ в исследуемом объекте. **Поляризационная микроскопия**. В микроскопах этого типа световой пучок разлагается на два луча, поляризованных во взаимно перпендикулярных плоскостях. Проходя через структуры ткани со строгой ориентацией молекул, лучи запаздывают друг относительно друга вследствие неодинакового их преломления. Возникающий при этом сдвиг фаз является показателем двойного лучепреломления клеточных структур (таким способом были исследованы, например, миофибриллы).

**Архивирование материала, оставшегося от гистологического исследования.**

Органы ткани, а также их фрагменты, оставшиеся после вырезки и заливки материала, хранят в 10% нейтральном формалине в больших емкостях с плотно закрывающимися крышками – влажный архив. Каждый объект завязывают в марлю вместе с биркой, на которой указан год и номер исследования. Бирку помещают таким образом, чтобы ее можно было рассмотреть не развязывая марлю. Существует и более современный способ хранения: материал вместе с этикеткой помещают прозрачный и прочный полиэтиленовый пакет, наливают в него немного формалина и склеивают с помощью специального аппарата. Этот пакет помещают в другой пакет большего размера для полной герметизации. Пакеты размещают на стеллажах.

Также существуют архивы гистологических препаратов и блоков; документации ПАО.

Гистологические препараты (стекла) предпочтительнее хранить в вертикальном положении, исключая попадание на них прямого солнечного света для избежания выцветания.

**СРОКИ ХРАНЕНИЯ БИОПСИЙНО-ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА**

· гистологические препараты, относящиеся к онкологическим заболеваниям, а также во всех неясных случаях, хранятся бессрочно

· парафиновые блоки, относящиеся к онкологическим заболеваниям, а также во всех неясных случаях, хранятся 10 лет. Уничтожаются без составления акта.

· Гистологические препараты, парафиновые блоки и «влажный» архив (в нейтральном растворе формалина) биопсийного материала при травмах органов и тканей хранятся 3 года. Уничтожаются с составлением акта за подписью заведующего и старшего лаборанта.

· Все прочие гистологические препараты и парафиновые блоки хранятся 1 год. Уничтожаются без составления акта.

· «Влажный» архив (в нейтральном растворе формалина) хранится 1 год. Уничтожаются без составления акта. Может быть уничтожен сразу после установки диагноза (кроме онкологических и инфекционных заболеваний и неясных случаев).

· Уничтожение (утилизация) биоматериалов осуществляется в соответствии с действующими нормативами и документами по утилизации биоотходов.

**12 день.**

**Задание:**

**оформление результатов исследования на бланках.**

**- оценивать качество приготовленных гистологических препаратов.**

**- интерпретировать результаты исследования.**

Весь материал для исследования из лечебных отделений доставляется в патологоанатомическое отделение после операции в фиксирующей жидкости (10% р-р формалина). Хранение материала без фиксации недопустимо. На банку, содержащую объект, наклеивается ярлык с указанием фамилии и инициалов больного, лечебного отделения и номера истории болезни. Помещать в одну посуду несколько объектов исследования от разных больных разрешается только при условии, если каждый из них завязывает в марлю вместе с биркой. На бирке пишутся Ф. И.О. и возраст больного.

2. Присланный объект, непригодный для исследования (подсохший, загнивший, замороженный), не принимается на исследование, о чем немедленно ставят в известность заведующего лечебным отделением.

3. На каждый подлежащий исследованию объект заполняется бланк направления. Он доставляется вместе с объектом в патологоанатомическое отделение. Все графы бланка должны быть заполнены таким образом, чтобы производящий исследование патологоанатом имел достаточно клинических сведений при оценке обнаруженных морфологических изменений.

Бланк заполняется врачом лечебного отделения немедленно после окончания операции. Объект, направленный на исследование, должен соответствовать данным сопроводительного бланка.

4. Если немедленная отправка объектов на исследование невозможна, оперировавший хирург обеспечивает правильную фиксацию и сохранность.

5. При доставке материала из других ЛПУ фиксированные объекты доставляются курьером.

6. Ткани и органы, полученные при биопсии с диагностической целью, категорически запрещается делить на части и посылать их в несколько патологоанатомических отделений, так как морфологические изменения, характерные для данного процесса (рак, туберкулез и т. д.), могут оказаться только в одной части объекта, и результаты исследования будут различными. Это может дезориентировать лечащих врачей и нанести вред больному.

7. В патологоанатомическом отделении ответственность за исследование биопсии возлагается на заведующего, техническая часть - на лаборанта, выделенного для этой работы. На лаборанта возлагается прием, регистрация, гистологическая обработка биопсийного материала, органов и тканей, удаленных при хирургических операциях, и отправка результатов исследований в лечебные отделения.

Весь персонал патологоанатомического отделения несет ответственность за сохранения принятого и обработанного материала, что нередко решает вопрос о здоровье и жизни больного.

8. Исследование присланных кусочков тканей и органов для диагностических биопсий и послеоперационного материала рекомендуется проводить в течение 3-4 суток.

9. Поступившие в лабораторию объекты на исследование вместе с сопроводительным бланком принимаются лаборантом, при этом проверяется, соответствует ли поступивший объект указанному на бланке, все ли графы бланка заполнены.

**оценивать качество приготовленных гистологических препаратов.**

Качественно приготовленный гистологический препарат должен:

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

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

* окраска срезов должна быть равномерной с четким дифференцированием различных структур;
* срезы должны быть хорошо просветлены;
* не допустимо загрязнение срезов инородными частицами, кристаллами красителя, а также попадание пузырьков воздуха под покровное стекло;
* из одного объекта изготавливают 1 - 2 среза для одной методики окраски;

· при необходимости число срезов может быть большим, вплоть до серии последовательных срезов;

* после изготовления препаратов на предметном стекле тушью или восковым карандашом обозначают номер экспертного исследования и год изготовления гистологических препаратов.

**13 день.**

**Задание:** Выполнение мер санитарно-эпидемиологического режима в ККПАБ и цитологической лаборатории:

- проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты;

**Стерилизация**— обработка объектов, при которой достигается полное уничтожение всех микроорганизмов. В результате стерилизации объект становится свободным как от патогенных, так и от сапрофитных микробов. Существуют различные методы и способы стерилизации, в основе которых лежит действие физических или химических факторов. Критерием гибели микроорганизмов является необратимая утрата способности к размножению, что можно оценить путем количественного подсчета числа колоний после высева смывов на чашки с питательными средами.

Наиболее широко применяют методы тепловой стерилизации: кипячением, сухим жаром в атмосфере горячего воздуха или влажным жаром при помощи пара, а также прокаливанием предметов в огне.

*Прокаливание на огне* — надежный метод стерилизации бактериологических петель, металлических и стеклянных предметов. Однако применяется ограниченно ввиду их порчи.

*Стерилизация сухим жаром* или горячим воздухом производится в сушильных шкафах или печах Пастера при температуре 160—170°С в течение 1—1,5 ч по достижении заданной температуры. Этим методом стерилизуют лабораторную посуду, инструменты, минеральные масла , вазелин. Жидкости и резину сухим жаром стерилизовать нельзя. Предметы, подлежащие стерилизации, заворачивают в бумагу или закладывают в металлические пеналы для предохранения от последующего загрязнения. Необходимо помнить, что при темпера-, туре выше 170°С начинается обугливание бумаги, ваты, марли, а при более низкой температуре не происходит гибели спор.

*Стерилизация кипячением*в течение 30 мин убивает вегетативные формы микробов. Споры многих бактерий при этом сохраняются, выдерживая кипячение в течение нескольких часов. Для уничтожения вирусов — возбудителей болезни Боткина необходимо кипячение в течение 45—60 мин. Кипячению в специальных стерилизаторах подвергают шприцы, хирургические инструменты, иглы, резиновые трубки. Для повышения точки кипения и устранения жесткости воды добавляют 2% гидрокарбоната натрия.

*Стерилизация насыщенным паром*под давлением (автоклавирование) является наиболее надежным и быстрым методом стерилизации. Обеспложивание достигается воздействием пара, температура которого под давлением выше, чем температура кипящей воды: при давлении 0,5 атм 112°С, при 1 атм. 121 °С , при 1,5 атм 127°С и при 2 атм 134°С.

*Стерилизация текучим паром* проводится в аппарате Коха или в автоклаве при не завинченной крышке и открытом выпускном кране. На дно аппарата Коха наливают воду и нагревают до 100°С. Образующийся пар движется вверх через заложенный материал и стерилизует его. Так как однократное действие паров воды не убивает споры, применяют дробную стерилизацию — 3 дня подряд по 30 мин. Споры, не погибшие при первом прогревании, прорастают до следующего дня в вегетативные формы и погибают при втором и третьем прогревания.

Тиндализация – дробная стерилизация, которая проводится при температуре ниже 100 оС. Тиндализацию проводят на водяной бане по часу при температуре 60 – 65 оС в течение пяти дней или при 70 – 80 С три дня. Используют для обеззараживания питательных сред, содержащих белок, кровяную сыворотку, витамины, ферменты.

**Дезинфекция** — уничтожение патогенных микробов в окружающей человека среде. Методы и способы дезинфекции. различны, но они преследуют цели уничтожения не всех микроорганизмов, а только патогенных. Уничтожение возбудителей инфекционных заболеваний в переносчиках называют дезинсекцией, а в организме грызунов — источников инфекции — дератизацией.

При выполнении различных видов дезинфекции применяют механические, физические и химические способы и средства. К первым относятся мытье рук с мылом и щеткой, влажная уборка помещений, стирка белья, проветривание помещений и др., преследующие цель удаления микроорганизмов с объекта. Физические способы: кипячение, сжигание, обработка паром (текучим и под давлением) с использованием автоклава и дезинфекционных камер, приводят к уничтожению патогенных микробов. Применение химических дезинфицирующих средств целесообразно сочетать с механическими способами и действием физических факторов.

**Стерилизацию питательных сред** осуществляют различными способами в зависимости от тех ингредиентов, которые входят в их состав.

* Синтетические среды и все агаровые среды, не содержащие в своем составе нативного белка и углеводов, стерилизуют 15-20 мин в автоклаве при температуре 115-120°С.
* Среды с углеводами и молоком, питательный желатин стерилизуют текучим паром при температуре 100°С дробно или в автоклаве при 112°С.
* Среды, в состав которых входят белковые вещества (сыворотка крови, асцитическая жидкость), обеспложиваются тиндализацией или фильтрованием.
* Для стерилизации питательных сред, содержащих в своем составе нативные белки, пользуются фильтрацией через мембранные фильтры Зейтца.

Лабораторную посуду стерилизуют:

а) сухим жаром при температуре 150, 160 и 180?С соответственно 2 часа, 1 час и 30 минут.

б) в автоклаве при давлении 1 атм. В течение 20-30 минут

**- утилизация отработанного материала.**

Все медицинские отходы, кроме отходов категории А, представляют серьезную угрозу для здоровья человека и сохранности окружающей среды, поскольку могут содержать различные яды, радиоактивные изотопы и сохраняющие активность патогенные микроорганизмы.

Депонирование Б, В, Г, Д-категорий отходов на территории обычных полигонов категорически не допускается. Действующими санитарными правилами обозначена обязательная **утилизация медицинских отходов класса Б** и В с применением термической обработки – сжигания, пиролиза (СанПиН 2.1.7.728-99).

Отходы категории А ничем не отличаются от твердых бытовых отходов (ТБО), за исключением источника их происхождения. Соответственно, на них распространяются обычные правила утилизации. Допустимо захоронение такого мусора на специальных полигонах (самый дешевый способ) или, например, **утилизация медицинских отходов методом газификации**, иначе пиролиза.

Это наиболее эффективный, на сегодняшний момент, метод переработки мусора с точки зрения экологичности, безопасности и извлечения дополнительной выгоды. В результате такой переработки отходы превращаются в газ, который можно использовать для получения электро- или теплоэнергии.

К перевозке отходов кроме категории А предъявляются требования обязательной упаковки в герметично закрывающуюся тару. Мешки и контейнеры – тара, в которой производится транспортировка и дальнейшая **утилизация медицинских отходов (мешки** обязательно различаются по цвету для разных категорий отходов) - дополнительно маркируются этикетками с датой и литерой принадлежности к конкретной категории отходов. В качестве материала тары наиболее распространены различные модификации пластика.

Поскольку **утилизация медицинских отходов класса Б в РФ** - наиболее востребованная операция для большинства ЛПУ, достаточно остро стоит вопрос обеспечения медицинских учреждений специальными установками, необходимыми для обеззараживания и утилизации отходов на местах.

Аппараты, способные за несколько этапов произвести измельчение, термическую обработку и расфасовку полученных уже неопасных зольных остатков в пакеты, могли бы существенно облегчить процесс сбора и сортировки мусора в ЛПУ, сэкономив время и силы персонала. Например, сейчас у младшего и среднего медицинского персонала работа, связанная только с дезинфекцией отходов, может отнимать до 1/5 общего рабочего времени.

На текущий момент **утилизация медицинских отходов методом сжигания** производится, большей частью, на территориях специальных центров утилизации, а не на территории ЛПУ. Проведение работ по сортировке, транспортировке и уничтожению отходов с помощью сотрудников специализированных фирм – отличная альтернатива самостоятельной установке дорогостоящего оборудования.

Порядок уничтожения медицинских отходов класса Г подразумевает обязательную классификацию степени токсичности отходов (от этого зависит способ конечной утилизации мусора). Для определения уровня токсичности используются расчетный и/или экспериментальный методы. Каждая процедура подлежит обязательному документированию. Правильная **утилизация медицинских отходов класса Г** предполагает наличие у предприятия специальной лицензии на переработку данной категории мусора.

Особого внимания требует **утилизация медицинских отходов класса Д**, то есть отходов, содержащих радиоактивные вещества. Утилизация осуществляется только специализированными лицензированными предприятиями. Часть радиоактивных отходов подлежит обязательному захоронению, часть может быть переработана для вторичного использования (например, цезий-137).

**Лист лабораторных исследований.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследования.  | Количество исследований по дням практики.  |  |  |  |  | итог  |
| 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10  | 11  | 12  | 13  | 14  | 15  | 16  | 17  | 18  |   |
| изучение нормативных документов  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| прием, маркировка, регистрация биоматериала.  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| организация рабочего места  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| приготовление срезов  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| уплотнение материала  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| обезвоживание  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| фиксация  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| окрашивание срезов  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| обработка биопсийного материала  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| приготовление препаратов для электронно – микроскопического исследования  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| микроскопия  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| регистрация результатов исследования  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| утилизация отработанного материала  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

**Приложение 2**

**ОТЧЕТ ПО ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКЕ**

Ф.И.О. обучающегося \_\_\_Хертек Даяна Андреевна

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Группы **специальности 31.02.03 -Лабораторная диагностика** Проходившего (ей) производственную практику с по 20 г

За время прохождения практики мною выполнены следующие объемы работ:

1. **Цифровой отчет**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№**  | **Виды работ**  | **Количество**  |
| 1.  | - изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в ККПАБ. - ознакомление с правилами работы в гистологических лабораториях |   |
| 2.  | * прием, маркировка, регистрация биоматериала.
* устройство микроскопов и техника микроскопирования.

-устройствосанного микротома и микротомных ножей.  |   |
| 3.  | - приготовление реактивов, подготовка оборудования, посуды для исследования  |   |
| 4.  | * приготовление гистологических срезов;
* уплотнение материала;
* обезвоживание;
* фиксация;
* техника окрашивания срезов:

а) предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской. -предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской. б) проведение окрашивания срезов, наклеенных на предметные стекла и свободноплавающих срезов. в) просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы) ; * обработка биопсийного материала;
* приготовление препаратов для электронно – микроскопического исследования
 |   |
| 5  | Регистрация результатов исследования.  |   |
| 6  | проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; - утилизация отработанного материала. |   |

1. **Текстовой отчет**
2. Умения, которыми хорошо овладел в ходе практики:

1. Самостоятельная работа:

1. Помощь оказана со стороны методических и непосредственных руководителей:

1. Замечания и предложения по прохождению практики:

Общий руководитель практики **\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(подпись) (ФИО)

М.П.организации

**Приложение 3**

**ХАРАКТЕРИСТИКА**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

*ФИО*

обучающийся (ая) на 3 курсе по специальности  **31.02.03 Лабораторная диагностика**

успешно прошел (ла) производственную практику по профессиональному модулю:

 **Проведение лабораторных гистологических исследований**

в объеме\_\_\_108\_\_\_ часов с « » \_\_\_20 г. по « » \_\_20 г.

в организации\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

*наименование организации, юридический адрес*

За время прохождения практики:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № ОК/ПК  | Критерии оценки  | Оценка (да/нет)  |
| ПК 5.1, ОК13  | Быстро и правильно готовит рабочее место в соответствии с методикой.  |   |
| ПК5.2 ОК 2  | Соблюдает методику при выполнении унифицированных исследований. Правильно интерпретирует результаты исследований.  |   |
| ПК 5.3   | Соблюдает форму заполнения учетно-отчетной документации (журнал, бланки).  |   |
| ПК 5.4, ОК 11  | Проводит мероприятия по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты. Утилизирует отработанный материал в соответствии с инструкциями и СанПин.  |   |
| ОК 1  | Демонстрирует интерес к профессии. Внешний вид опрятный, аккуратный.  |   |
| ОК 6  | Относится к медицинскому персоналу и пациентам уважительно, отзывчиво, внимательно. Отношение к окружающим бесконфликтное.  |   |
| ОК 7  | Проявляет самостоятельность в работе, целеустремленность, организаторские способности.  |   |
| ОК 9  | Способен освоить новое оборудование или методику (при ее замене).  |   |
| ОК 10  | Демонстрирует толерантное отношение к представителям иных культур, народов, религий.  |   |
| ОК 12  | Способен оказать первую медицинскую помощь при неотложных ситуациях  |   |
| ОК14  | Соблюдает санитарно-гигиенический режим, правила ОТ и противопожарной безопасности. Отсутствие вредных привычек. Участвует в мероприятиях по профилактике профессиональных заболеваний  |   |

«\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_20\_\_ г

подпись непосредственного руководителя практики

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_/ФИО, должность м.п.

Подпись общего руководителя практики \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_/ФИО, должность

**Лист регистрации изменений**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер измене ния  | Внесенные изменения  | Основания для внесения изменений  | Подпись  | Расшифровка подписи  | Дата  |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |