**День 1**

**Техника безопасности.**

1. Работать только в халатах.
2. Содержать в чистоте и порядке свое рабочее место. Не заставлять его посудой реактивами и инструментами.
3. Не допускать посторонних лиц в лабораторию.
4. Не хранить продукты, не пить воду, не принимать пищу и не курить.
5. Не бросать в раковину бумагу, фильтры и не сливать осадки. В раковину сливать только чистую воду.
6. Бережно и аккуратно обращаться с посудой, приборами и оборудованием
7. Не пробовать химические вещества и реактивы на вкус, не оставлять их в посуде без этикеток. Со всеми химическими веществами обращаться как с ядами, так как ион в той или иной степени вредны.
8. Опыты проводить только в чистой посуде. Посуду мыть сразу же после опыта.
9. Соблюдать осторожность при работе с горючими веществами.
10. Работы проводить только при исправных вентиляции, электрооборудовании, канализационной и водопроводной системах.
11. В лаборатории иметь:
12. а) аптечку с набором медикаментов; б) средства пожаротушения; в) инструкцию по технике безопасности.

Требования безопасности по окончании работы:

1. После окончания работы следует тщательно вымыть руки. Необходимо убрать свои рабочие места, закрыть и поставить в вытяжной шкаф все сосуды с летучими и легковоспламеняющимися веществами.
2. Инструментарий, перчатки и стол с доской, на которой производится вырезка, после окончания работы должны быть хорошо вымыты водой и обработаны дезинфицирующим.
3. При уборке помещения в конце рабочего дня полы моют с применением дезинфицирующего раствора, стены, двери, полки, подоконники, окна, шкафы протирают дезинфицирующим раствором.
4. По завершении всех работ персонал лаборатории должен отключить приборы и аппараты, которые были использованы в процессе работы, снять халат, колпак, спецобувь и убрать их в специальный шкаф.

**День 2**

**Приготовление парафиновых блоков.**

Мною было изготовлено 12 парафиновых блоков.

Пропитанные парафином кусочки ткани выкладывают в специальные формочки и заливают расплавленным в термостате или на водяной бане при 60 °С парафином, в который добавлено 1 — 3 % воска.



Для получения парафиновых блоков нужной формы используют различные приспособления. К ним относятся изготовляемые самим лаборантом бумажные коробочки, на дно которых выкладывают кусочки, а рядом к боковой стенке ставят этикетку номером кнаружи; металлические Г-образные угольники или разъемные формочки, которые перед употреблением смазывают глицерином и помещают на нагретую металлическую пластинку, выполняющую роль дна формочек. Применяют также различные пластмассовые коробочки и формы, в частности используемые в микробиологии, особенно при заливке мелких объектов, таких как материал пункционных биопсий.

Специальные импортные аппараты для заливки в парафин (так называемые заливочные центры) снабжены набором различных формочек (кассет) и пинцетов. В них обеспечивается автоматическая подача дробных доз парафина оптимальной температуры.

Раскладывание кусочков в формочки и их ориентирование нужно проводить быстро теплым пинцетом. Если материала для заливки много и он быстро остывает, то можно использовать парафин, подогретый на водяной бане до 60 °С. Для охлаждения формочки с материалом рекомендуют помещать в воду при 10— 18 °С, но не погружать в нее. При застывании парафина поверхность блока стягивается, и в нем образуется кратерообразное углубление. Это нужно учитывать при заливке кусочков и в дальнейшей работе с блоками. Парафин должен на 3—4 мм выступать над поверхностью блока, если предстоит монтировать его на деревянную колодку. Возможны также заливка блока большим количеством парафина и резка без использования деревянных колодок, с успехом применяемая даже на санном микротоме.

В большинстве руководств рекомендуют после подравнивания и удаления лишнего парафина наклеивать блоки на деревянные бруски с помощью подогретого на спиртовке металлического шпателя или скальпеля. Затем для обеспечения более прочного приклеивания основания блок оплавляют с четырех боковых сторон тем же горячим шпателем или скальпелем.

**День 3**

Методический день. Заполнение дневника.

**День 4**

**1.****Приготовление парафиновых блоков.**

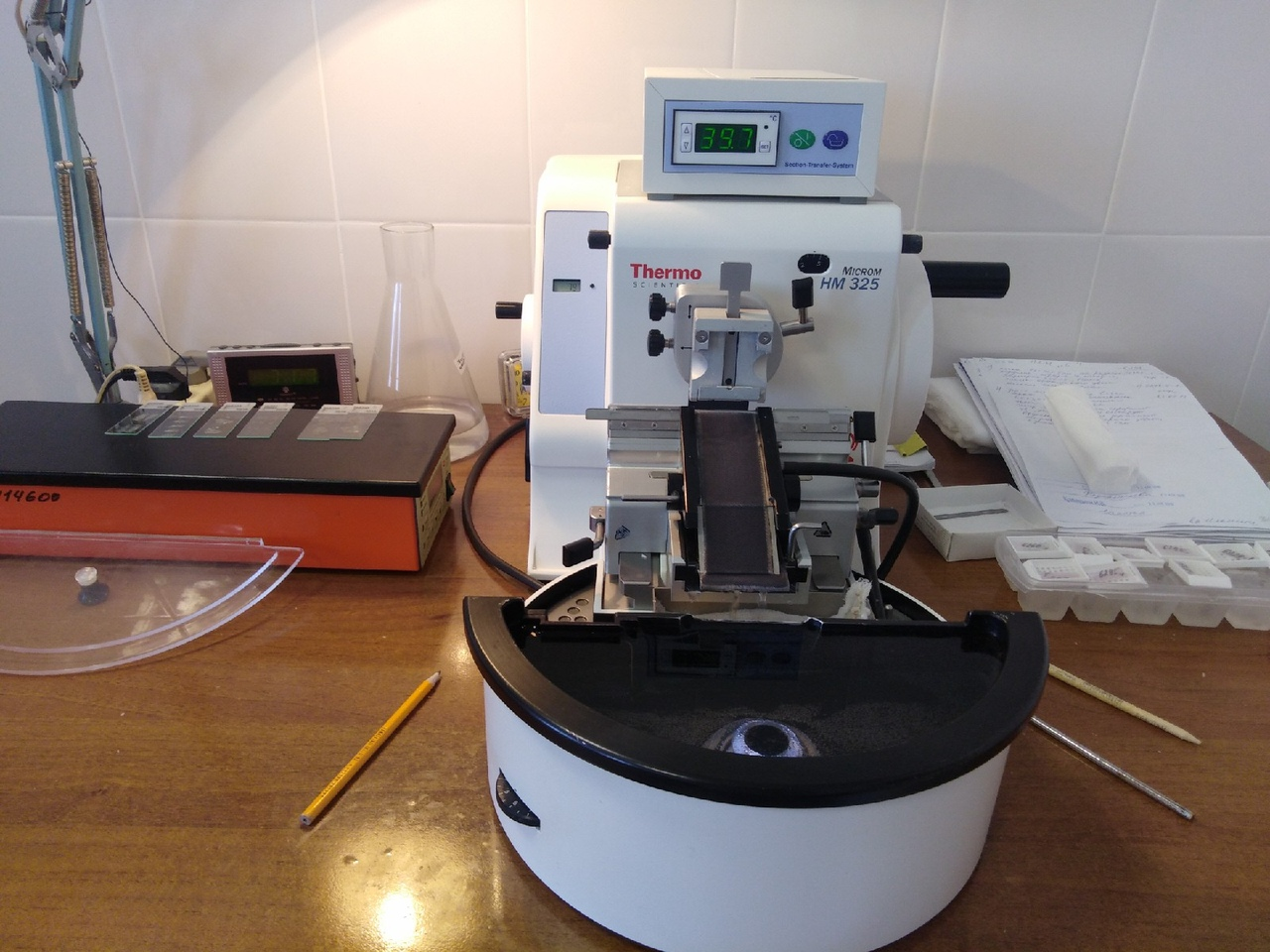
Мною было изготовлено 25 парафиновых блоков.

**2.Изготовление срезов.**

Мною было изготовлено 10 гистологических срезов.

Парафиновый блок, наклеенный на деревянную колодку или без нее (с большим слоем парафина), зажимают в объектодержатель. Установив нужный угол наклона ножа (оптимальный 13-15°) в зависимости от плотности ткани, медленно подводят нож к блоку, регулируют его высоту до соприкосновения с ножом. Сначала выравнивают поверхность блока, установив микрометрическую шкалу на получение толстых (20-25 мкм) срезов, затем шкалу переводят на б -8 мкм и приступают к резанию материала. Как правило, нож располагается перпендикулярно, но возможно также получение срезов (особенно с более плотных объектов) ножом, который установлен под углом к станине микротома.

Срезы с блока осторожно снимают с помощью сухой или смоченной в спирте кисточки, используют также изогнутую препаровальную иглу или скальпель. Часто срезы наклеивают на предметное стекло непосредственно с ножа. Для этого их переносят в склянку с теплой (35-40 °С) дистиллированной или кипяченой водой, а затем вылавливают на предметные стекла, которые предварительно обезжиривают и натирают белком с глицерином.

 Имеются специальные импортные ванночки для расправления срезов и переноса их на стекло. В них постоянно поддерживается оптимальная температура воды 38 °С.

Продолжительность просушивания срезов в термостате при 37 °С 6-12 ч. В случае необходимости проведения срочной окраски срезы можно поместить на 10-15 мин в термостат при 56 °С до начала плавления парафина, что способствует лучшей фиксации среза на предметном стекле.

**День 5**

**Прием и маркировка гистологического материала.**

Материал для патогистологического исследования доставляется с направлением на патогистологическое исследование которое заполняется лечащим врачом или врачом, осуществляющим забор материала для исследования.

В направлении на патогистологическое исследование четко обозначаются:

- наименование лечебного учреждения, фамилия, имя отчество, возраст и пол больного, номер карты амбулаторного или стационарного больного.

- дата и время взятия материала, количество направляемых объектов (при необходимости описание или схема места взятия материала), подробные клинические данные, включающие предполагаемый клинический диагноз, проводимое или проведенное ранее лечение (химиотерапевтическое, лучевое, оперативное и др.), данные предшествующего патогистологического исследования (если оно производилось) и других методов исследования (если это необходимо).

- фамилия, имя, отчество врача, направившего материал на исследование, другая информация, важная для установления патологоанатомического (патогистологического) диагноза.

Диагностический и операционный материал, доставленный на патогистологическое исследование, должен быть тщательно маркирован с указанием фамилии, инициалов больного и номера истории болезни. Эти данные наносят (или наклеивают) на емкость с объектом, подлежащим исследованию. Рекомендуется использование специальных контейнеров и бирок для направления материала на патогистологическое исследование.

**День 6**

**Взятие материала.**

ТЕХНИКА ВЫРЕЗКИ МАТЕРИАЛА

Оптимальная площадь кусочков ткани 2 — 3 см 2, толщина 5 — 7мм.

Вырезанные кусочки ткани непосредственно с лезвия ножа погружают в фиксатор. Недопустимы сдавливание кусочков, промывание их водой, а также очистка поверхности органа, особенно слизистой оболочки, инструментами, пальцами и т.д. При погружения кусочков( в кассетах) в сосуд с фиксатором, к каждому кусочку прилагают этикетку с номером (шифром, маркировкой),написанным карандашом или тушью на матовой поверхности фотобумаги.



При наличии патологически измененных участков тканей и органов кусочки вырезают на границе с нормальной тканью.

Кусочки полых органов вырезают таким образом, чтобы в препарате были видны все слои стенки. Кусочки стенки полого органа удобно предварительно распластывать на фотобумаге или картоне.

Для изучения стенки сосуда на большом протяжении его разрезают вдоль, свертывают в виде рулона и прошивают посередине.

Для исследования рыхлой соединительной ткани готовят пленчатые препараты: после осторожной препаровки соединительнотканную пленку натягивают пинцетом на обезжиренное предметное стекло и фиксируют.

Для текущей обработки инструментов используют 6%перекись водорода.

**День 7**

**Фиксация материала.**

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ФИКСАЦИИ

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов.

Фиксация всегда приводит к большим или меньшим изменениям структуры и объема ткани, степень выраженности которых зависит от рН фиксатора, его концентрации, температуры, продолжительности воздействия и других факторов. Слишком продолжительная фиксация приводит к значительному уплотнению материала, что в дальнейшем затрудняет его обработку. Для каждого конкретного вида исследования подбирают наиболее приемлемый фиксатор.

Полноценная фиксация материала обеспечивается при соблюдении ряда требований.

1. После вырезки кусочка ткани его немедленно погружают в фиксатор.

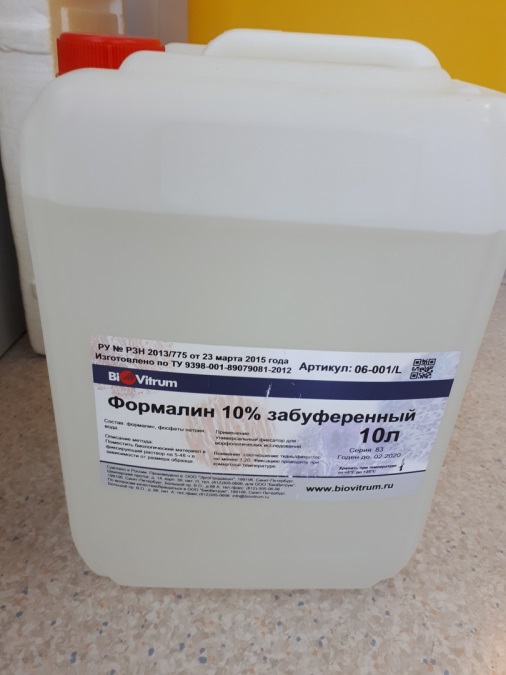
2. Объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 10-20 раз, так как тканевая жидкость может существенно изменить концентрацию фиксатора.

3. В том случае, если цвет фиксатора изменяется после погружения в него кусочков ткани, фиксатор необходимо немедленно сменить.

4. Недопустимо повторное использование фиксаторов.

5. Для каждого фиксатора следует соблюдать установленное время фиксации.

Для фиксации лучше использовать емкости с широким горлом, чтобы не возникло проблем с извлечением фиксированного материала. Равномерность фиксации некоторых рыхлых тканей, например легочной, достигается помещением их на дно банки, а поверх них — прокладки из слоя марли или ваты.

ПРОСТЫЕ ФИКСИРУЮЩИЕ ЖИДКОСТИ

*Формалин*. Основным, широко применяемым фиксатором служит формалин, представляющий собой 40 % раствор формальдегида. Из него готовят нейтральный (забуференный до рН 7,0) 10-12 % формалин. Универсальным фиксатором, пригодным для гистологических и большинства гистохимических исследований, является нейтральный формалин по Лилли.

*Этиловый спирт (80 %, 90 %, 96 % и 100 %).* Его применяют в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку. Продолжительность фиксации от 2 ч до 1 сут.

*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.

*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 %

СЛОЖНЫЕ ФИКСАТОРЫ

Составными частями сложных фиксаторов являются простые

*Спирт-формол по Шафферу* — 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.

*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.

*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.

*Кальций-формол по Бейкеру* используют для фиксации липидов. Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20 °С.

*Жидкость Карнуа* — универсальный фиксатор для большинства гистологических и гистохимических исследований (кроме выявления липидов). Продолжительность фиксации 2-4 ч при 4 °С или 1-2 ч при 20 °С. Затем материал помещают в 100 % спирт. Если материал не сразу подлежит проводке, то его можно перенести в 96 % спирт и держать в нем до 3 сут.

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.

**День 8**

**Обезвоживание материала.**

После фиксации, для которой применялся формалин, кусочки промывают в течение 6,12 или 24 ч в проточной воде: на водопроводный кран надевают резиновую трубку, конец которой опускают в широкогорлую банку, закрытую марлей.

СПОСОБЫ ОБЕЗВОЖИВАНИЯ ТКАНЕЙ

Перед заливкой материала в парафин пли целлоидин его необходимо обезводить. Существует несколько традиционных способов обезвоживания. Самым распространенным является обезвоживание в спиртах восходящей концентрации, начиная с 70 %. Обычно применяют батарею спиртов, состоящую из двух порций 96 % и двух — 100 % спирта. Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах в среднем 48 ч в зависимости от качества материала (содержания жира в ткани) и размера кусочков, а также от их количества. При использовании автомата для заливки количество спиртов увеличивают, а при проведении кусочков по спиртовой батарее вручную их осторожно промокают фильтровальной бумагой или салфеткой из марли, что позволяет реже менять спирты в батарее.

Процесс обезвоживания можно ускорить, периодически встряхивая кусочки в банках со спиртами или поместив их в термостат при 37 °С. Спирты в батарее необходимо своевременно заменять. Контролировать пригодность спирта позволяет проба с водой. В отлитое из банки небольшое количество спирта добавляют 1 каплю воды. Помутнение раствора свидетельствует о необходимости замены спирта в батарее.

При отсутствии 100 % спирта в батарею включают еще одну порцию 96 % спирта. Однако в этом случае всегда есть опасность недостаточного обезвоживания и возникновения трудностей при получении срезов.

С целью ускорения обезвоживания применяют ацетон без примесей (ЧДА), предварительно добавив в него силикагель для удаления остатков воды или дистиллированный ацетон. Обезвоживание проводят в 2—3 сменах ацетона от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины объектов. Обезвоживание тканей возможно с помощью 99 % изопропилового спирта, который непосредственно смешивается с парафином без промежуточных растворителей (ксилол, хлороформ и др.). Таким же свойством обладает диоксан, однако в связи с высокой токсичностью он не нашел широкого применения в патогистологической технике

Для обезвоживания глицерином кусочки ткани последовательно помещают в 60 %, 80 % и 100 % глицерин на 3—4 ч, а затем в смесь, состоящую из равных частей 100 % глицерина и ксилола.

Проводку также проводят в специальном оборудовании(стейнеры)

**День 9**

Методический день. Заполнение дневника.

**День 10**

**Покраска гистологических срезов.**

Мною было окрашено 68 гистологических срезов.

Парафиновые срезы требуют наиболее сложной подготовки. Так как парафин не обладает достаточной прозрачностью и затрудняет процесс окрашивания (гистологические красители — это водные или спиртовые растворы, плохо проникающие в парафинированные ткани), его необходимо удалить из среза. Для этого срез подвергают депарафинированию — процессу, обратному тому, который осуществлялся при подготовке объекта к заливке в парафин, т.е. срезы последовательно проводят через растворитель парафина, спирты нисходящей крепости и помещают в воду. Сначала этикетируют биологические стаканчики (или высокие бюксы), наливают в них соответствующие растворы и устанавливают в определенной последовательности, обеспечивающей проведение манипуляций по следующей схеме:

• ксилол — три смены по 10 мин;

• удаление лишнего ксилола фильтровальной бумагой;

• спирт 96° — две смены по 2—3 мин;

• спирт 70° — 2—3 мин;

• вода дистиллированная — 2 мин и больше.

**Методы окрашивания срезов и покрытие покровными стеклами**

1. Окраска гематоксилин -эозином

Самый распространённый метод окраски. Сочетает основной и кислый красители. Поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие неклеточные структуры.

-Ядра приобретают сине-фиолетовый цвет, цитоплазма - желтовато-розовый цвет.

Замечание: используемый гематоксилин готовится по методу Эрлиха: окисляется до гематеина калийными квасцами.

2. Окраска железным гематоксилином (по методу Генденгайна)

Препарат предварительно обрабатывают (протравляют) железноаммиачными квасцами, а потом обрабатывают гематоксилином.

- Структуры приобретают коричневато-серый цвет. Хорошо выявляются структуры ядра, границы клеток, мышечные волокна. 

3. Окраска по методу Ван Гизону

Краситель - смесь растворов пикриновой кислоты и кислого фуксина.

-Коллагеновые волокна (содержащиеся в межклеточном веществе соединительной ткани) окрашиваются в ярко-красный цвет, а элементы других тканей (напр., мышечные волокна) -в жёлтый цвет.

4. Окраска по методу Маллори

Краситель является трёхцветным: это смесь кислого фуксина, анилинового синего,оранжевогo G, а также двух кислот.

- Коллагеновые волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-синий цвет; многие другие структуры (ядра, мышечные волокна, эритроциты) - в оранжевый или красный цвет.

5.Импрегнация серебром

Препарат обрабатывают аммиачным раствором серебра, а затем - восстановителями. В итоге, выделяющееся серебро осаждается на определённых волокнах соединительной ткани.

-Ретикулярные (аргирофильные) волокна приобретают чёрный цвет, коллагеновые волокна - коричневый, ядра клеток - светло-коричневый.

6. Окраска орсеином

-Эластические волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-красный цвет;остальные структуры - в слабо-розовый цвет.

7. Окраска гематоксилин- пикрофуксином

-Эластические волокна окрашиваются пикриновой кислотой в жёлтый цвет, коллагеновые волокна - в красный цвет, ядра клеток - окрашиваются гематоксилином в тёмно-фиолетовый цвет.

7. Окраска по методу Шморля

Используется для окраски костей и дентина. Предварительно кусочки материала подвергают декальцинации (с помощью кислоты), а затем выдерживают в растворе алюмокалиевых квасцов. Краситель - раствор тионина.

-Стенки костных полостей и канальцев (выстланные сетью коллагеновых волокон) окрашиваются в тёмно-коричневый цвет; б) остальной фон - светло-коричневый.

**День 11**

Мною было изготовлено 32 парафиновых блоков и 13 гистологических срезов.

**День 12-14**

Методический день. Заполнение дневника.

**День 15**

Мною было изготовлено 5 гистологических срезов.

Присутствовала на вскрытии человека.

**День 16**

Покраска и покрытие покровными стеклами гистологических срезов.

Мною было окрашено 100 гистологических срезов.