

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

Фармацевтический колледж

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Тема: Специальные методы окрашивания, применяемые в гистотехнике в
современной лаборатории.

по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

Выполнил: Горюнова Анастасия Павловна (Горюнова)

Руководитель: Догадаева Елена Григорьевна (Догадаева)

Рецензент: Макеев Юрий Анатольевич (Макеев)

заведующий патологоанатомическим отделением ФГБУ ФСНКЦ ФМБА России КБ № 42

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

Протокол № 9 от «28» мая 2018 г

Красноярск 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1.ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ОКРАСОК.....	6
1.1 Взятие материала. Аутопсия	6
1.2 Фиксация материала	7
1.3 Приготовление срезов	7
1.4. ОКРАШИВАНИЕ СРЕЗОВ	8
ГЛАВА 2.САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ ПРОВЕДЕНИЕ СПЕЦИАЛЬНЫХ ОКРАСОК В СОВРЕМЕННОЙ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	17
2.1 специальные окраски используемые.....	17
2.2 Количество вскрытий в г. железнгорске за последние три года.....	20
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	23
ПРИЛОЖЕНИЕ А	25
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	30
ПРИЛОЖЕНИЕ В	31

ВВЕДЕНИЕ

Гистологическое исследование является одним из наиболее достоверных методов диагностики патологических процессов, и сам факт его проведения часто считается залогом правильности полученных результатов. Большое значение для анатомической патологии имеет гистопатология, представляющая собой изучение пораженной ткани под микроскопом. Гистопатологическая экспертиза образцов необходима для точной диагностики заболеваний. Биологическая ткань отличается небольшим присущим контрастом под светом или электронным микроскопом. Чтобы придать ткани контраст, а также выделить представляющие интерес особенности, применяется окрашивание. В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания.

Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии протравы, например, гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.

Результаты окраски в значительной степени зависят от предшествующей обработки объекта. Гистологическая окраска — сложный процесс, в котором играют роль многие физические и химические факторы, связанные со свойствами как красителя, так и окрашиваемого объекта. Гистологические красители классифицируют по источникам получения (натуральные и синтетические), по химическому строению (азокрасители, хинонимидные и т.

д.), по способу использования (протравные и т. п.), возможности избирательно окрашивать объект (ядерные, цитоплазматические и т. п.) и по другим свойствам. По наиболее распространенной классификации красители подразделяют на основные, кислые, нейтральные и индифферентные. Основные красители представляют собой красящие основания или чаще их соли (метиленовый синий, толуидиновый синий, азуры, тионин, а также гематоксилин, бисмарк коричневый и др.). Окрашиваемые ими структуры называют базофильными. Интенсивность базофильной окраски зависит от числа кислотных групп, способных реагировать с красителем. Кислые красители — это красящие кислоты или их соли (пикриновая кислота, эозин, эритрозин, конгорот, лихтгрюн, оранжевый и т. д.). Окрашиваемые ими структуры называют ацидофильными, а также оксифильными или эозинофильными. К нейтральным красителям относятся смеси, содержащие как основные, так и кислые красящие компоненты, например смесь Романовского— Гимзы. Наконец, красящие свойства индифферентных красителей связаны с их способностью растворяться в определенных веществах. Так, например, судан III или шарлах-рот хорошо растворяются только в жирах и вследствие этого избирательно окрашивают их в красно-оранжевый цвет.

Способы окрашивания гистологических структур весьма многообразны. Существующие теории (химическая, электроколлоидальная, физико-химическая, обменной адсорбции) касаются какого-то одного из механизмов окрашивания, но не охватывают всего многообразия связывания красителей со структурами клеток и тканей.

От окраски в собственном смысле слова отличают импрегнацию — специальный метод выявления структур клеток и тканей, основанный на различной их способности удерживать или восстанавливать соли тяжелых металлов (серебра, свинца, осмия, золота).

При судебно-медицинской экспертизе механических повреждений одним из важных вопросов является установление прижизненности и давности их

возникновения. Пожалуй, единственным, широко применяемым в судебной медицине методом, остаётся гистологический метод. Микроскопическое исследование позволяет объективно диагностировать прижизненность и сроки давности повреждений на основании выявления неспецифических вазомоторных, воспалительных и пролиферативных реакций в области повреждения..

Материалом судебно-гистологического исследования являются фрагменты органов трупа или (реже) вещественные доказательства, предположительно содержащие следы тканей или органов человека.

Цель: Изучить специальные методы окрашивания, применяемые в гистотехнике в современной лаборатории.

Задачи:

- 1.Изучить теоретические основ специальных методов окрашивания , применяемые в гистотехнике в современной лаборатории
- 2.Самостоятельно провести взятие материала, фиксацию, приготовление гистологических срезов и специальный метод окраски;
- 3.Статистика специальных методов окрашивания, применяемых в гистотехнике в современной лаборатории за 3 года

Объект исследования: Аутопсийный материал.

Предмет исследования: Ткани трупа.

Базы: ФГБУ ФСНКЦ ФМБА России КБ № 42

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

ГЛАВА 1.ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ОКРАСОК.

В человеческом теле существуют много различных по форме и типу клеток. Их всегда можно отличить, особенно здоровые от больных, этим занимается гистология. Специалисты патологической гистологии исследуют подозрительные клетки и ткани. Уже через несколько часов гистолог может сказать, здоровы или нет клетки ткани. Этому заключению предшествует несколько этапов обработки данного материала. Изготовление гистологических препаратов включает:

- 1) Взятие материала;
- 2) Фиксацию материала;
- 3) Приготовление гистологических срезов;
- 4) Окрашивание срезов.

1.1 ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА. АУТОПСИЯ

Аутопсия - посмертное вскрытие и изучение тела, в том числе внутренних органов. Вскрытие часто производится для того, чтобы установить причину смерти. Проводят аутопсию в ближайшие сроки с момента смерти, чтобы различные посмертные изменения не мешали обнаружению истинной причины смерти. Многие заболевания, равно как и насильственные действия, оставляют явные повреждения на кожных покровах и поверхностных оболочек глаз, носа и рта. Вначале производят очень тщательный наружный осмотр. Затем труп вскрывают, и исследуют все внутренние органы. Тщательная аутопсия предполагает не только осмотр невооруженным глазом, но и микроскопическое изучение гистологических препаратов органов и тканей. Окончательный диагноз всегда основывается на данных микроскопии.

Вырезка

Так как для гистологического исследования нужны небольшие кусочки, то для их получения производится вырезка, т.е. взятие материала определенного органа размером 1,5*1,5 см. Затем материал фиксируют.

1.2 ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА

Сущность фиксации заключается в том, чтобы сохранить взятые кусочки органов и тканей от гниения и ферментативных процессов, изменяющих структуру тканей. Фиксируемые ткани претерпевают ряд физико-химических изменений. Наиболее существенными из них являются: быстрое свертывание белков и отчасти липоидов и переход их в такое состояние, при котором ткани не изменяются от длительного хранения и во время последующих обработок. Фиксацию тканей производят в жидкостях различного состава. Наиболее употребляемыми являются формалин, спирт, реже ацетон, сулема и др.

1.3 ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕЗОВ

Для изготовления гистологических срезов фиксированная ткань нуждается в дополнительном уплотнении. Для этого существует несколько методов: замораживание ткани, пропитывание ее целлоидином, парафином и т. п.

После фиксации и уплотнения ткани тем или иным способом готовят срезы. Для получения тонких срезов одинаковой толщины, годных для макроскопического исследования, пользуются особыми аппаратами микротомов. Их существует несколько типов.

Наиболее употребительными являются замораживающие и санные микротомы. Принцип устройства их состоит в том, что после каждого среза столик, к которому прикреплена исследуемая ткань, поднимается на заданную высоту. Таким образом, срезы получаются одинаковой толщины. Срез должен

быть достаточно тонким и прозрачным, обычно изготавливают срезы толщиной от 4 до 15 мкм

1.4. ОКРАШИВАНИЕ 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.

Альциан синий

Альциан синий, окрашивает кислые гликозаминогликаны (слизь) в вакуолях клеток Гоблета в зеленовато-голубой цвет, что делается для выявления и оценки количества клеток продуцирующих слизь. Также используется, когда необходимо окрасить хрящевую ткань.

Ализариновый красный С

Ализариновый красный используется для выявления выпавших в ткани солей кальция. С солями двухвалентных металлов даёт прочные ярко окрашенные лаки, что используется в гистологии и гистохимии. Так, кальций, образуя лак, хорошо определяется в замороженных и парафиновых срезах, в окрашенных препаратах кости. Лак, образованный с солями железа получил название «железный ализарин» (железо-аммонийные квасцы с ализариновым красным С) и, будучи использован в одной прописи с кристаллвиолетом, интенсивно окрашивает в красновато-фиолетовый цвет митохондрии.

Окраска по Бильшовскому (Bielschowsky)

Этот способ окраски с использованием солей серебра, применяется в неврологии для окраски нервных волокон и клеток, часто при патоморфологической верификации дегенеративных заболеваний нервной системы.

Окраска по Кахалю

Другая техника окраски нервной ткани открытая итальянским физиологом Камилло Гольджи. Окрашивание Гольджи стало широко использоваться благодаря испанскому нейроанатому Сантьяго Рамон-и-Кахаль (Ramon y Cajal, Santiago Felipe) (1852-1934). Клетки в нервной ткани находятся в густой сети нервных отростков и расположены друг к другу чрезвычайно плотно, и только малое количество информации о их структурах и взаимосвязях может быть получено, если окрасить все клетки. Более того, тонкие выросты (аксон и дендриты) слишком тонкие и прозрачные, чтобы быть видимыми при помощи обычной техники окрашивания. По методу Гольджи окрашивается только малое количество клеток, механизм, из-за которого это происходит, до конца не известен. Дендриты окрашиваются в коричневый и чёрный цвета, что позволяет определить их длину и сделать видимой сложную пространственную сетевую структуру многих частей мозга.

Конго красный (Конго рот)

Эта окраска применяется для выявления амилоида – специфического белково-полисахаридного комплекса накапливающегося в тканях и органах человека при нарушении белкового обмена. Накапливаясь, он естественно нарушает работу этих органов вплоть до развития их недостаточности. Окрашенные конго-красным препараты, могут быть также исследованы в поляризованном свете и тогда, отложения амилоида демонстрируют свечение ярко-зеленого цвета (в англоязычной литературе - Apple green)

Крезил фиолетовый

Другой, широко используемый способ окраски нервной ткани. Используемый краситель обладает щелочной реакцией, соответственно с наибольшей готовностью, он будет связываться с кислыми веществами,

такими как нуклеиновые кислоты ДНК и РНК, которые в больших количествах присутствуют в нейронах. В комбинациях с другими красителями, такими как люксол быстрый синий по Клювер-Барреру. Дополнительно окрашиваются вещества гликолипопротеид - липофусцин, так называемый пигмент изнашивания, накапливающийся в клетках при их старении. Этот метод окраски, гораздо лучше выявляет детали строения нейронов и применяется при диагностике демиелинизирующих заболеваний нервной системы, а также заболеваний сопровождающихся деградацией нейронов.

Окраска по методу Фонтана-Массон

Специальная окраска для выявления аргентофильных гранул, а также и меланина. Окраска чаще применяется при диагностике болезней кожи. При этой гистохимической окраске меланин и аргентофильные гранулы тонкого кишечника получают черными, а ядра клеток – красными.

Окраска по Гимзе

Это, прежде всего, классическая окраска для исследования мазков крови при общем/клиническом исследовании крови, а также мазков костного мозга, кроме того, применяется для визуализации хромосом и микроорганизмов – грибов, гистоплазм, хламидий, малярийных плазмодиев.

Трехцветная окраска по Маллори

Используется для исследования волокнистых структур соединительной ткани используется три красителя: анилиновый синий, кислый фуксин и оранжевый "Ж". В основе метода лежит уникальное свойство анилинового синего окрашивать коллагеновые волокна в зеленовато-голубой, а кислого фуксина — эластические волокна в красный цвет. В результате окраски, коллагеновые волокна — темно синие, ядра, эритроциты, эластические

волокна — красные, амилоид, гиалин и слизь — голубые, мышечная ткань — оранжевая, нейроглия — красно-фиолетовая. Окраска по Маллори чрезвычайно распространена в различных вариантах.

Трехцветная окраска по Массону

Используется главным образом для того, чтобы дифференцировать клеточные и неклеточные структуры (элементы соединительной ткани) в срезе тканей. В большинстве рецептов, коллагеновые, эластиновые и мышечные волокна окрашиваются в ярко-красный цвет, коллаген и кость в цвета от зеленого до синего, цитоплазма клеток в светло-красный или розовый, а ядра в цвета от темно-коричневого, до черного. Часто используется в патологической анатомии глазного яблока. Модифицированная окраска по Масону, дополненная окраской по Фон Косса для выявления солей фосфора (часто вместе с ним и кальция).

Пентахромная окраска по Мовату.

Оригинальная методика разработана Генри Золтаном Моватом в 1955 с целью разделить при помощи цветов в одном единственном слайде различные компоненты соединительной ткани. В 1972 году Г. К. Расселом техника окраски модифицирована для того чтобы повысить достоверность и надежность окраски. В окраске, как следует из ее названия, образуется пять цветов, сочетаясь в одном препарате, они производят довольно сильное впечатление. При использовании этой окраски, в черный цвет окрашиваются ядра клеток и эластические волокна, в желтый — коллагеновые и ретикулиновые волокна, в голубой — муцин и межклеточный матрикс, в ярко красный — фибрин и темно-красный цвет — мышечная ткань.

Масляный красный О (судан красный 5В)

Одна из окрасок на жиры, применяемая для выявления в клетках нейтральных триглицеридов и липидов. В судебной медицине может использоваться для выявления жировой эмболии легких. Также в 2004 году была разработана методика окраски старых отпечатков пальцев на пористых поверхностях таких как бумага, картон.

Орсеин

Эта гистологическая окраска используется для выявления эластиновых волокон, особенно это актуально в патологической анатомии кровеносных сосудов. Этот краситель добывается из нескольких видов лишайников. На снимке ниже представлены эластиновые мембраны аорты – самого крупного сосуда тела человека, функция которого заключается смягчить, мощную «ударную волну» сердечного сокращения и провести поток крови к более мелким ветвям. Аорта относится к сосудам эластического типа, так как в ее стенке содержится множество таких эластиновых мембран, куда больше чем в артериях других типов.

Осмия тетроксид (Оксид осмия(VIII))

Другая окраска на жироподобные вещества, хотя сейчас, чаще используется как фиксатор для приготовления препаратов для электронной микроскопии. Он связывает ненасыщенные липиды (в области двойных связей) и, таким образом ткани с большим количеством полиненасыщенных жиров окрасятся в черный цвет.

Сафранин-О

Протоколы включающие в себя этот гистологический краситель, который окрашивает муцин, хрящи и цитоплазматических гранул тучных клеток, в насыщенно красный и оранжевый цвет, связываясь с содержащимися в них кислыми протеогликанами.

Окраска по Ван-Гизону

В окраске по Ван-Гизону используется смесь пикриновой кислоты и кислого фуксина. Эта окраска – самый простой метод дифференцировать коллагеновые волокна от прочих компонентов соединительной и гладкомышечной ткани. Метод разработан американским бактериологом Ира Ван-Гизоном (Ira Thompson Van Gieson). При использовании этого метода коллагеновые волокна окрашиваются в красный цвет. Клетки гладкомышечной и поперечнополосатой ткани, ороговевающий многослойный плоский эпителий и гиалин разных оттенков желтого вплоть до коричневатого, а ядра клеток – черными.

Окраска по Вергофу

Эта окраска разработана американским хирургом офтальмологом и патологом Фредериком Германом Вергофом (Frederick Herman Verhoeff). Методика предназначена для выявления в тканях нормальных или патологически измененных эластических структур. Молекулы красящего вещества образуют химические связи с эластином – главным компонентом некоторых эластических тканевых структур, которых много в тканях, одним из важнейших физиологических качеств которых, является растяжимость к таким относятся, например кожа, артерии и вены, легочная ткань, эластические хрящи. Эластин обладает высокой афинностью по отношению к хлориду железа III с гематоксилином, задерживающий большее количество красящего вещества, таким образом, выделяя эластиновые волокна в срезе ткани. Избыток краски удаляется, оставляя окружающие ткани практически прозрачными, для того чтобы они стали видимыми, используют «контр окраску», чаще всего по методу Ван-Гизона, уже описанному выше.

Окраска по Фон Косса (von Kossa)

Эта окраска используется для исследования степени минерализации ткани, то есть выявления выпавших в ткани нерастворимых фосфатов. Принцип окраски заключается в преципитации ионов серебра в кислой среде. Фотохимический распад образующихся фосфатов серебра до металлического серебра, происходящий под воздействием света (процесс, по своей сути, аналогичен таковому происходящему при печати фотографий) позволяет выявить наличие в ткани фосфатов, (чаще всего именно фосфатов кальция), но окраска выявляет лишь присутствие фосфатов, а не кальция самого по себе. Для выявления солей кальция требуются другие окраски, например, уже описанный, ализарин красный. Цветовая схема при этой окраске следующая: фосфаты кальция в массивных депозитах – черного цвета, в мелкодисперсных отложениях – серого. Клеточные ядра – красные, а цитоплазма клеток – светло-розового цвета.

Окраска берлинской лазурью

Она же железная лазурь, прусский синий, парижская лазурь, прусская лазурь, гамбургская синь, нейблау, в гистологии же известна как реакция Перлса. Этот метод очень распространен в гистологии для выявления в тканях соединений железа (например, при диагностике гемохроматозов и выявления гемосидероза – состояний при которых в тканях, по тем или иным причинам, накапливается избыток соединений железа, что, в конечном счете, приводит к недостаточности внутренних органов). Но, что интересно, здесь используется не готовый пигмент для окраски, а образование пигмента в этом случае, происходит непосредственно в срезе ткани и его образование, связанное с присутствием соединений железа, расценивается как положительная реакция.

Оригинальная методика окраски, описанная в 1867 году как «берлинская лазурь Перлса» названа в честь ее автора – германского патолога Макса Перлса (Max Perls) (1843–1881), использовавшего растворы гексацианоферрата (II) калия и соляной кислоты. Депозиты соединений железа в тканях под действием этих растворов образуют собственно

берлинскую лазурь, гранулы которой, цвета разных оттенков синего, видны в препарате под микроскопом.

Макрофаги нагруженные железосодержащим пигментом гемосидерином в печени мыши. Селезенка является своего рода "кладбищем для эритроцитов" здесь эритроциты отслужившие свой век (это около 120 дней) задерживаются и разрушаются, а из пигмента гемоглобина извлекается "железо" и используется для синтеза новых молекул кислородсвязывающего белка – гемоглобина

Пикросириус красный

Применяется для селективного выявления коллагена I и III типа. Окрашенные по этому методу препараты могут быть исследованы как при помощи стандартной светлопольной световой микроскопии, тогда коллагеновые волокна будут окрашены в ярко-красный цвет, на бледно-желтом фоне, а клеточные ядра, в идеале, - черного цвета, но также могут быть серые или коричневые.

Окраска по Шморлю

Предназначена для окраски костной ткани, для того, чтобы увидеть «лакуны» и «ламеллы» компактной костной ткани, изучение их морфологии имеет большое значение в при диагностике заболеваний костной ткани. На снимке видны окрашенные в красно-бурый цвет «лакуны» в которых находятся остециты – зрелые клетки костной ткани, заключенные между окрашенными в зеленоватый цвет «ламеллами» - межклеточным веществом кости, образованном коллагеновыми волокнами, организованными в циркулярно расположенные, в виде цилиндра пластинки, окружающие центральные или гаверсовы каналы, в которых проходят питающие кость сосуды – на снимке видны как крупные, оптически прозрачные отверстия. В тонких каналцах перпендикулярно пронизывающих ламеллы содержатся отростки остецитов. Таким образом на этом снимке хорошо видно, что кость это не нечто замершее и мертвое, а совершенно такой же живой орган, как и

сердце и печень, только процессы в этом органе протекают намного медленнее, месяцами и годами.

ГЛАВА 2.САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ ПРОВЕДЕНИЕ СПЕЦИАЛЬНЫХ ОКРАСОК В СОВРЕМЕННОЙ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

2.1 СПЕЦИАЛЬНЫЕ ОКРАСКИ ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ

Я проходила преддипломную практику в патологоанатомическом отделении больницы ФГБУЗ КБ № 42 ФМБА России г. Зеленогорска.

Присутствовала на 19 вскрытиях. Помогала врачам патологоанатомам в вырезке аутопсийного материала и проводила исследование гистологических препаратов. Всего мною было сделано 35 аутопсийных препаратов.

Для приготовления препаратов я использовала специальные окраски.

Окраска по Бильшовскому

Этот способ окраски применяется в неврологии для окраски нервных волокон и клеток.

Реактивы, используемые для окраски:

1. 100 мл 2 % раствор нитрата серебра
2. 5 капель 40 % раствора гидроксида натрия
3. 3-5 капель 1% трихлорида золота
- 4.100 мл дистиллированной воды
- 5.10 мл аммиака
6. 100 мл 5 % раствор тиосульфата натрия

Способ окраски:

Перед окраской срезы проходят процедуру депарафинизации в батареях ксилолов и спиртов.

Батарея ксилолов представляет собой 4 стакана с ксилолом. Время нахождения срезов в 1 стакане 20 минут.

Батарея спиртов представляет собой 4 стакана со спиртами. Первых три стакана содержат 96 % спирт, последний стакан содержит 70 % спирт, являясь переходной средой после 96% спирта и водными красителями.

- 1) срезы помещают в 2 % раствор нитрата серебра на 24 ч;
- 2) быстро (2 — 3 с) проводят через дистиллированную воду, сменяя стеклянные палочки;
- 3) помещают в свежеприготовленный раствор аммиачного серебра: к 10 мл 10 % раствора нитрата серебра добавляют 5 капель 40 % раствора гидроксида натрия — образуется коричнево-черный осадок окиси серебра. После этого при постоянном взбалтывании к раствору серебра по каплям добавляют раствор аммиака (молекулярная масса 0,875 — 0,910) до тех пор, пока от растворяющегося осадка останется лишь несколько крупинок. После каждой капли выжидают 10 — 20 с, прежде чем добавить следующую каплю. Необходимо избегать избытка аммиака. Раствор разводят до 20 мл дистиллированной водой. В раствор аммиачного серебра срезы помещают на 10 — 20 мин, в нем они должны приобрести желтоватый оттенок;
- 4) быстро проводят через 2 — 3 порции дистиллированной воды;
- 5) восстанавливают в растворе формалина (1:4), не содержащем кислоты в течение 10 мин, — срезы быстро окрашиваются в темно-серый цвет;
- 6) промывают в воде 15 мин;
- 7) золотят в разбавленном растворе трихлорида золота (3 — 5 капель 1 % раствора желтого трихлорида золота на 10 мл дистиллированной воды) до тех пор, пока коричневый тон не перейдет в серый или серо-фиолетовый;
- 8) фиксируют 1—2 мин в 5 % растворе тиосульфата натрия;
- 9) тщательно промывают в обычной воде (1—2 ч); проводят через спирты, карбол-ксилол, ксилол (не дольше, чем нужно) и заключают в бальзам.

На хорошо импрегнированных препаратах нейрофибриллы и перицеллюлярные сетчатые структуры ганглиозных клеток черного цвета выделяются на светлом фоне, так же отчетливо видны тончайшие осевые цилиндры.

Ван Гизона

Данная окраска применяется для дифференцировки компонентов соединительной ткани и коллагеновых волокон

Реактивы, используемые для окраски:

1. 5 мл 1 % раствор кислого фуксина;
2. 100 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты
3. 100 мл гематоксилина Вейгерта

Методика окраски:

Первым этапом проходит депарафинизация, затем:

1. 3-15 мин окрашивают срезы в гематоксилине Вейгерта;
2. быстро споласкивают в воде;
3. помещают на 2-5 мин в краситель ван Гизона;
4. быстро споласкивают в воде;
5. Обезводят в спиртах восходящей крепости.
6. Просветлить в ксилоле и заключить в полистирол.

Результаты: ядра клеток приобретают черный цвет, коллаген- красный, фибрин- оранжевый, другие тканевые элементы- желтые.

Альциан синий

Данная окраска применяется для дифференцировки в тканях муцина.

Реактивы, необходимые для окраски:

1. 100 мл гематоксилина Гарриса
2. 100 мл дистиллированной воды
3. 100 мл альцианового синего

Методика окраски:

1. Депарафинизация.

2.Окрасить в гематоксилине Гарриса 1-3 мин или в квасцовом кармине 5-15 мин.

3.Дважды промыть в дистиллированной воде (по 1-2 мин).

4.Поместить в раствор альцианового синего на 3-20 минут.

5.Промыть в проточной воде 2-3 мин.

6.Обезводить в спиртах восходящей крепости.

7.Просветлить в ксилоле и заключить в полистирол.

Результаты: в результате обработки ядра клеток становятся фиолетовыми или карминово-красными.

2.2 КОЛИЧЕСТВО ВСКРЫТИЙ В Г. ЗЕЛЕЗНОГОРСКЕ ЗА ПОСЛЕДНИЕ ТРИ ГОДА.

Были изучены статистические данные вскрытий в г. Зеленогорске за 2015-2017гг и сделаны сравнительные диаграммы:

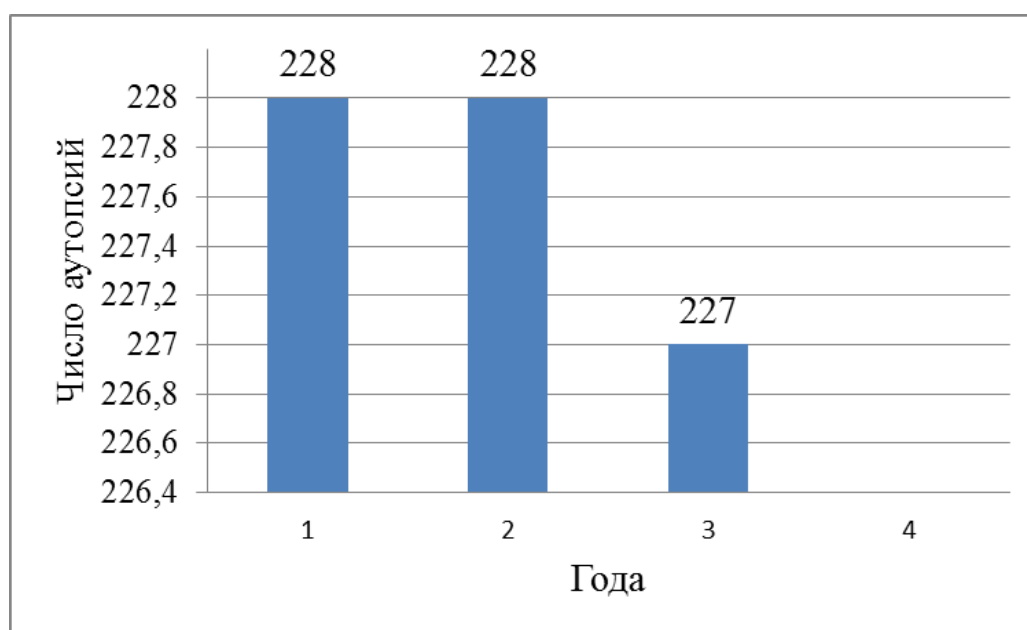


Рисунок 1- Все аутопсии в г.Зеленогорске 2015-2017гг.

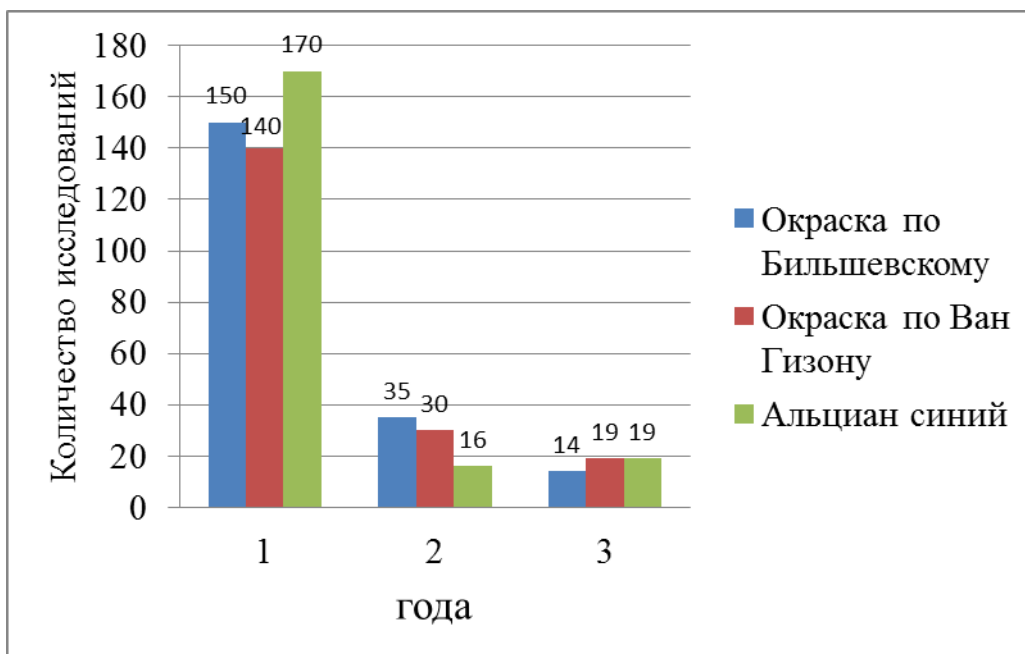


Рисунок 2- Специальные окраски, применяемые в ПАО за период 2015-2017 гг.

Основными заболеваниями, ведущими к смерти являются: новообразования, болезни органов пищеварения, болезни системы кровообращения.

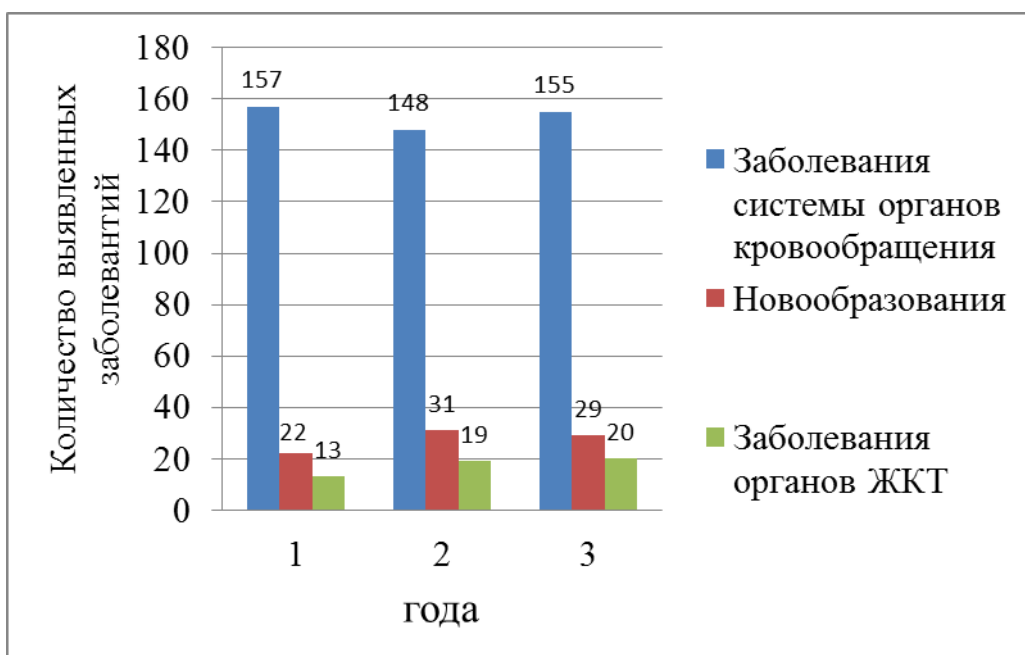


Рисунок 3- Виды заболеваний, выявленных при аутопсий в г.Зеленогорске в 2015-2017 гг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании всего вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

1. Анализ литературных источников позволил детально изучить методику проведения специальных гистологических окрасок.

2. Итог практической части - самостоятельно проведенная гистологическая окраска.

3. Проанализировав, данные смертности в Зеленогорске за три года, делаю вывод - лидирующими являются заболевания системы органов кровообращения, онкологические и заболевания желудочно- кишечного тракта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) Авдеев М. И, Курс гистологической медицины. - М., 2011.стр 35-38.
- 2) Анреп В. К, Оболонский Н. А, Материалы для судебно-медицинской диагностики // Сборник научных работ, произведенных в лаборатории.- СПб.,2006. Стр 30.
- 3) Быков В. Л, Цитология и общая гистология. — СПб.: СОТИС, 2012, стр. 13-14.
- 4) Касьянов М. И, Очерки медицинской гистологии. - М., 2012,стр. 22-24.
- 5) Кузнецов С.Л, Мушкамбаров Н.Н, Гистология, цитология и эмбриология – М., 2012, стр. 120- 123.
- 6) Наumenко В. Г, Митяева Н. А, Гистологический и цитологический методы исследования в гистологии (руководство). -М., 2011, стр. 25-41.
- 7) Пауков В.С, Литвицкий П.Ф, Патологическая анатомия и патологическая физиология- М., 2015, стр. 55- 58.
- 8) Полимпсестова О. А, Диагностика прижизненных и посмертных изменений в гистологических срезах. // Судебно-медицинская экспертиза. -М., 2012 № I. -стр.14-16
- 9) Прозоровский В. И, Кантер Э.И, Правила взятия, фиксации, обработки, исследования, хранения и документации трупного материала, предназначенного для гистологического исследования//Сборник организационно-методических материалов по гистологии. -М., 2013.Вып. 2. - стр.309-318.
- 10) Все лекции по гистологии. Статьи [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://www.studfiles.ru/preview/1659521> -Загл. с экрана.

- 11) Гистология- все для студента. Режим доступа: <http://www.twirpx.com/files/biology/gistology/> - Загл. с экрана.
- 12) Методы гистологического исследования [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://biofile.ru/bio/19223.html>- Загл. с экрана.
- 13) Морфология, физиология, гистология. Научные журналы и статьи. Режим доступа: <http://elementy.ru/catalog?genre=1&type=74> –Загл. с экрана, 2017.
- 14) Практика гистолога. Статьи. [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://practicagystologa.ru/2016/04/30/okraska-preparata/>- Загл. с экрана.
- 15) Статьи по гистологии. Фонд знаний «Ломоносов». Режим доступа: <http://lomonosov-fund.ru/enc/ru/encyclopedia:01101:articles> –Загл. с экрана, 2017.
- 16) Статья по актуальным вопросам патологоанатомических исследований [Электронный ресурс] -Режим доступа: <http://cyberleninka.ru/article/n/aktualnye-voprosy-patologoanatomicheskikh-issledovaniy-i-malotravmatichnye-tehnologii-pri-autopsii>- Загл. с экрана
- 17) Википедия [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki> - Загл. с экрана.
- 19) Список препаратов по частной гистологии [Электронный ресурс]- Режим доступа: http://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/histology/histology/r0/slst_c
- 20) Техника гистологического препарата [Электронный ресурс] –Режим доступа: <http://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/histology/histology/r1/t1.html> - Загл. с экрана.

Таблица 1 - сводный отчет по всем заболеваниям

Классы МКБ-10 и отдельные нозологические формы	Года		
	2015	2016	2017
<u>Некоторые инфекционные и паразитарные болезни</u> <i>в том числе:</i>	7	6	1
• Туберкулез	2	1	-
• Сепсис	-	-	-
• Менингококковая инфекция	-	-	-
• Вирусные гепатиты	1	3	-
• Инфекции кожи и ПЖК	1	-	-
• ВИЧ-инфекция	3	2	1
• Инфекции ЦНС	-	-	-
<u>Новообразования</u> <i>в том числе:</i>	22	31	29
•Рак ротоглотки	-	-	1
•Рак языка	-	-	2
•Рак пищевода	-	-	-
•Рак мочевого пузыря	-	-	1
•Рак трахеи, бронхов, ткани легкого	3	8	4
•Рак желудка	3	-	3
•Рак поджелудочной железы	5	2	2

•Рак печени	-	2	1
•Рак почки	-	1	-
•Рак ободочной кишки (включая ректо-сигмоидный отдел)	3	3	3
•Рак сигмовидной кишки	-	1	-
•ЗНО тонкого кишечника	1	-	-
•Рак шейки матки	-	-	3
•Рак прямой кишки	2	1	1
•Рак молочной железы	-	-	-
•Рак тела матки	-	-	-
•Рак яичников	-	-	-
•Рак яичек	-	-	-
•Рак предстательной железы	2	2	-
•Рак надпочечников	-	-	-
•ЗНО мягких тканей	1	-	-
•ЗНО головного мозга	-	3	2
•Лейкозы	-	5	3
•Лимфомы неходжкинские	-	-	1
•Лимфомы ходжкинские (ЛГМ)	1	-	-
•Первично-множественные опухоли	1	1	1
•Миелома множественная	-	-	1
•Меланома	-	2	-
<u>Нарушения, вовлекающие иммунный механизм</u>	-	-	-
• Саркоидоз	-	-	-
<u>Болезни эндокринной системы,</u>	6	-	2

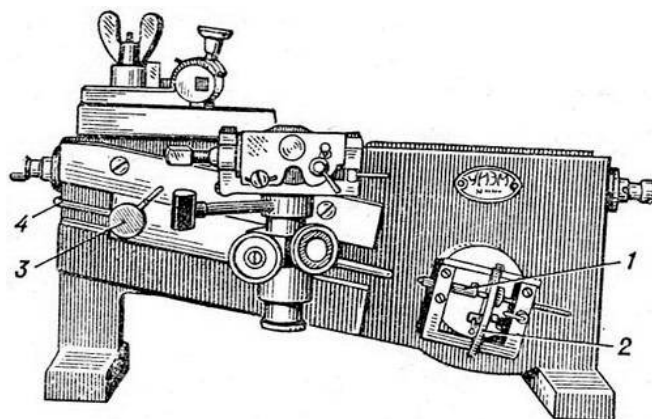
<u>расстройства питания и нарушения обмена веществ</u>			
<i>в том числе:</i>			
•Амилоидоз	-	-	-
•Сахарный диабет	6	-	2
<u>Психические расстройства и расстройства поведения</u>	2	3	4
<i>в том числе:</i>			
•Хронический алкоголизм	-	3	4
•Хроническая алкогольная интоксикация	2	-	-
<u>Болезни нервной системы</u>	3	1	-
<u>Болезни системы кровообращения</u>	157	148	155
<i>в том числе:</i>			
• Эндокардиты	2	1	-
• Генерализованный атеросклероз	14	8	5
• Атеросклеротические пороки сердца	-	-	3
• ХИБС	68	71	64
• Ревматизм, ревматические пороки сердца	-	1	1
• Инфаркт миокарда	8	16	18
• Инфаркт головного мозга	37	29	43
• Внутримозговое кровоизлияние	19	16	17
•Кардиомиопатии	-	3	1
•Дисциркуляторная энцефалопатия	6	1	2
• Аневризма аорты	2	2	1

• Васкулиты	-	-	-
• Тромбоз воротной вены	1	-	-
<u>Болезни органов дыхания</u> <i>в том числе:</i>	12	9	8
• Пневмонии в том числе:			
o Госпитальная	-	-	-
o Внегоспитальная	7	6	4
• ХОБЛ	2	3	3
• Грипп	-	-	-
• Интерстициальные заболевания легких	1	-	-
• Эмпиемы	2	-	-
• Бронхиальная астма	-	-	1
<u>Болезни органов пищеварения</u> <i>в том числе:</i>	13	19	20
• Язвенная болезнь желудка	-	3	1
• Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки	-	2	1
• Ущемленные грыжи	-	-	1
• Спаечная болезнь	-	-	1
• Алкогольная болезнь печени	1	3	2
• Цирроз печени	3	4	4
• Прочие болезни печени	-	-	-
• Желчекаменная болезнь	-	-	-
• Острый панкреатит (панкреонекроз) и его последствия	3	-	3

• Сосудистые болезни кишечника (тромбозы брыжеечных сосудов)	6	6	6
• Спонтанный разрыв пищевода	-	1	1
<u>Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани</u> <i>в том числе:</i>	-	-	-
• Подагра	-	-	-
<u>Болезни мочеполовой системы</u> <i>в том числе:</i>	3	2	5
• Гломерулонефрит,	-	-	1
• Мочекаменная болезнь	1	-	-
• Пиелонефрит	1	1	4
• Гнойный сальпингит и оофорит	-	-	-
• Гиперплазия предстательной железы	-	1	-
• Поликистоз почек	-	-	-
• Гангрена Фурнье	1	-	-
Травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин (посттравматическая энцефалопатия)	2	4	-
Передано в ОСМЭ	-	-	3
ИТОГО	227	228	227

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Микротом санный и замораживающий[14].



1 — микрометрический винт;

2 — перекидной механизм подачи;

3 — винт, фиксирующий стержень основания объектодержателя;

4 — стержень основания объектодержателя.

Рисунок 4- Саный микротом.

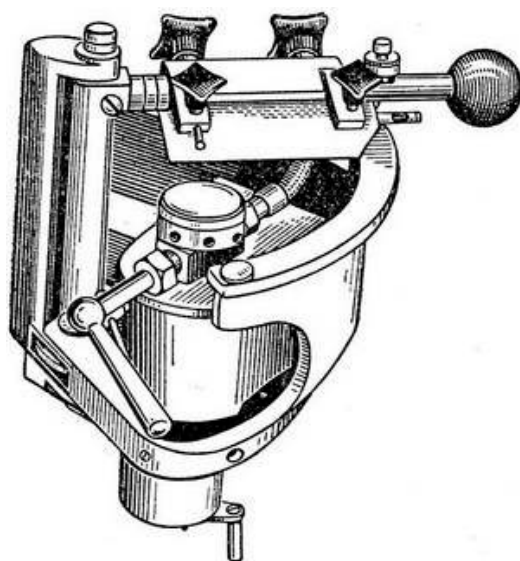


Рисунок 5- Замораживающий микротом.

Современное техническое оборудование патологоанатомического отделения.

1. Гистологический автомат Micro SCIENTIFIC MicromSTP 120.



Сложный комплексный прибор, предназначенный для фиксации, уплотнения и парафинирования тканей. Этот прибор значительно экономит время и создает дополнительный комфорт при выполнении исследовательских работ. Работая с таким автоматом, гистолог имеет возможность контролировать качество процесса, и формировать правильные задачи при помощи удобной панели управления. В каждом конкретном автомате имеется свой набор гистологических программ.

2. Прибор для окраски гистологических препаратов Micro SCIENTIFIC Microm HMS 70.



Современные приборы для окрашивания гистологических препаратов подразумевают возможность получения качественного равномерно окрашенного образца для исследования. Такой аппарат является отличным подспорьем для интенсивной потоковой работы исследовательской лаборатории. Применение подобного оборудования значительно экономит время на подготовку исследуемых образцов и обеспечивает возможность получения качественных результатов.

3. Криостат Leica CM 1950.



Криостат – современный высокоточный прибор, который позволяет осуществлять подготовку срезов из замороженных образцов тканей без предварительной фиксации. Такой прибор предполагает различный набор дополнительных функций. Каждая модель криостата снабжена безопасной подводкой образца к лезвию.

4. Микротом LeicaSM 2010 R.



Данный автоматический ротационный микротом для получения срезов высокого качества с твердых и мягких образцов для гистологических исследований, решения научно-исследовательских задач в области медицины, биологии и промышленности.

5. Заливочная станция (в парафин) ThermoSCIENTIFIC EC- 350.



Станция обеспечивает быстрое изготовление высококачественных парафиновых блоков, что в свою очередь облегчает изготовление качественного информативного среза, свободного от артефактов.

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