Ивановская государственная медицинская академия
Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии

1

Методы исследования в гистологии, цитологии и эмбриологии

Часть II

к.м.н., старший преподаватель М.Р. Гринева,
д.м.н., профессор С.Ю. Виноградов
д.м.н., профессор С.В. Диндяев

далее

Анализ гистологических препаратов

оглавление далее

Оглавление

Качественный анализ гистологических препаратов

- Обзорная микроскопия
  - Техника микроскопирования
  - Устройство светового микроскопа
- Интерпретация формы сечения объекта
  - Пример 1
  - Пример 2
- Интерпретация окрашивания тканей
  - Базофилия
  - Метахромазия
  - Оксифилия
  - Нейтрофилия
- Гисто- и иммуноцитохимические методы
  - Примеры
- Метод радиоавтографии

Количественный анализ гистологических препаратов

- Техническое оснащение морфометрических исследований
- Автоматизация морфометрических исследований

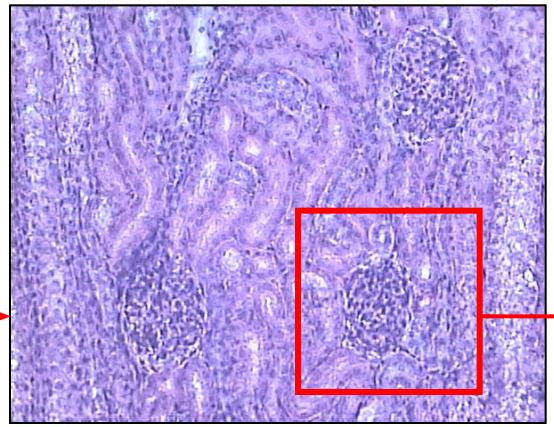
Рекомендуемая литература

Качественный анализ гистологических препаратов

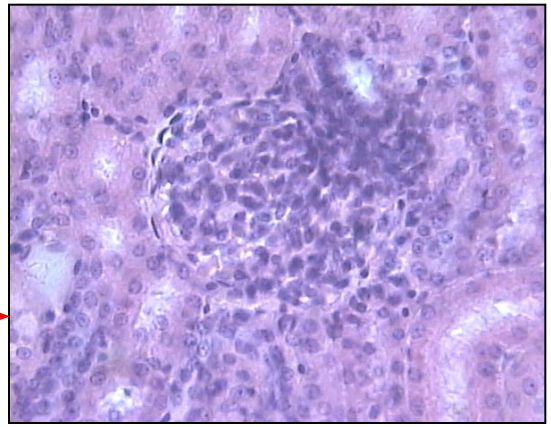
Обзорная микроскопия с помощью объективов различного увеличения

Используется для выявления общего плана строения органов, тканей, клеток.

Почка. Корковое вещество.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: х 56
(***малое увеличение***).



Почка. Корковое вещество.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: х 280
(***большое увеличение***).

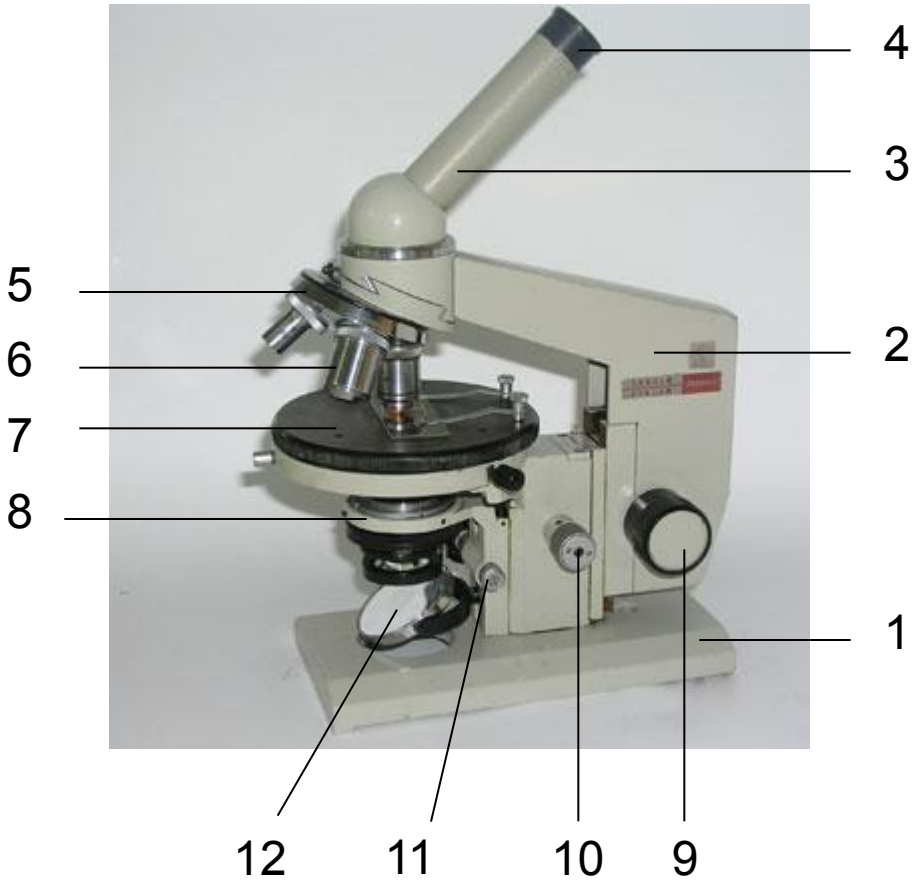


Почка. Почечное тельце.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: х 630
(***иммерсионное увеличение***).

Техника микроскопирования

1. Микроскопирование гистологического препарата начинают с установки правильного *освещения*. Для этого с помощью вогнутого зеркала, собирающего рассеянный пучок света, и конденсора достигают равномерного освещения поля зрения.
2. На предметный столик помещают гистологический препарат покровным стеклом вверх.
3. Изучение гистологического препарата начинают при *малом увеличении* (объектив х8), при этом расстояние между объективом и покровным стеклом должно быть около 1 см. *Установку резкости* проводят с помощью макровинта.
4. Рассматривают детали гистологического препарата по всей площади, перемещая его на предметном столике.
5. Устанавливают в центр поля зрения участок гистологического препарата, который следует изучить при *большом увеличении* (объектив х40).
6. С помощью револьверного устройства ставят объектив с более сильным увеличением (х40). *Установку резкости* проводят с помощью микровинта.
7. Для изучения очень мелких гистологических структур используют *иммерсионный объектив* (х90).
   - На покровное стекло препарата наносят каплю иммерсионного масла.
   - Осторожно опускают тубус до соприкосновения линзы объектива к маслу.
   - *Установку резкости* проводят с помощью микровинта.
   - После окончания работы иммерсионное масло удаляют с объектива и покровного стекла марлей.

Устройство светового микроскопа

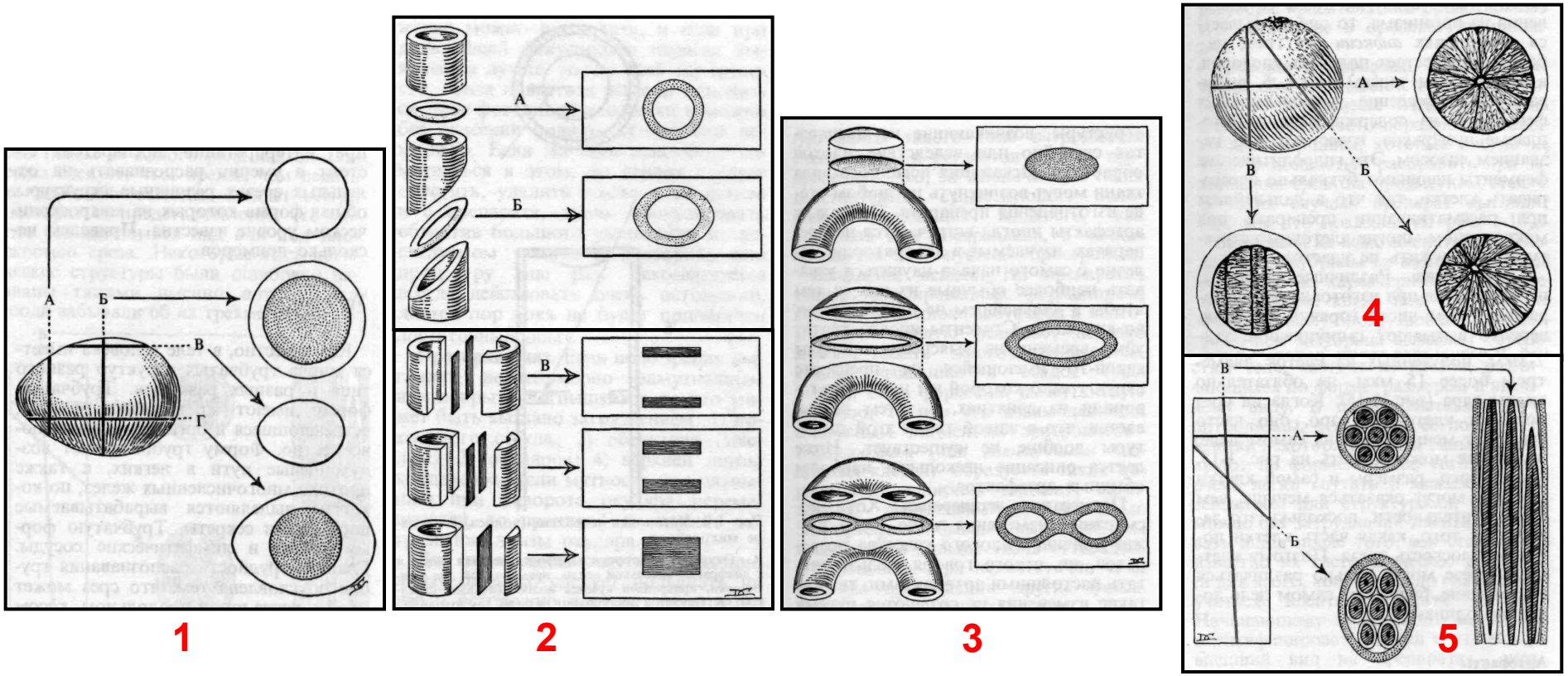


1. Основание микроскопа
2. Тубусодержатель
3. Тубус
4. Окуляр (чаще ×7)
5. Револьвер микроскопа
6. Объективы
   - а) сухие: ×8, ×20, ×40
   - б) иммерсионный ×90
7. Предметный столик
8. Конденсор
9. Макрометрический винт
10. Микрометрический винт
11. Винт конденсора
12. Зеркало

Общее увеличение микроскопа = увеличение объектива × увеличение окуляра

назад оглавление далее

Интерпретация формы сечения объекта



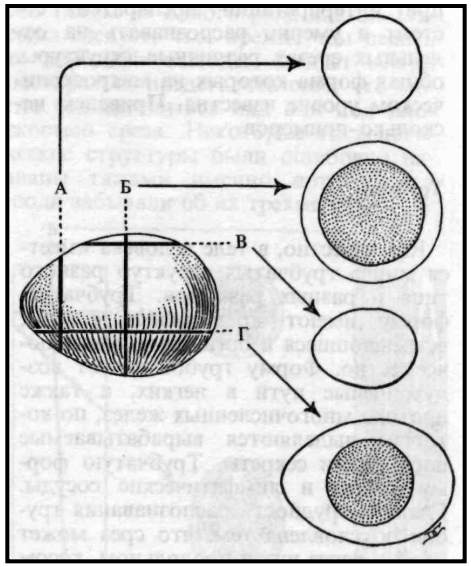
Схемы срезов, сделанных в разных плоскостях через объекты различной формы

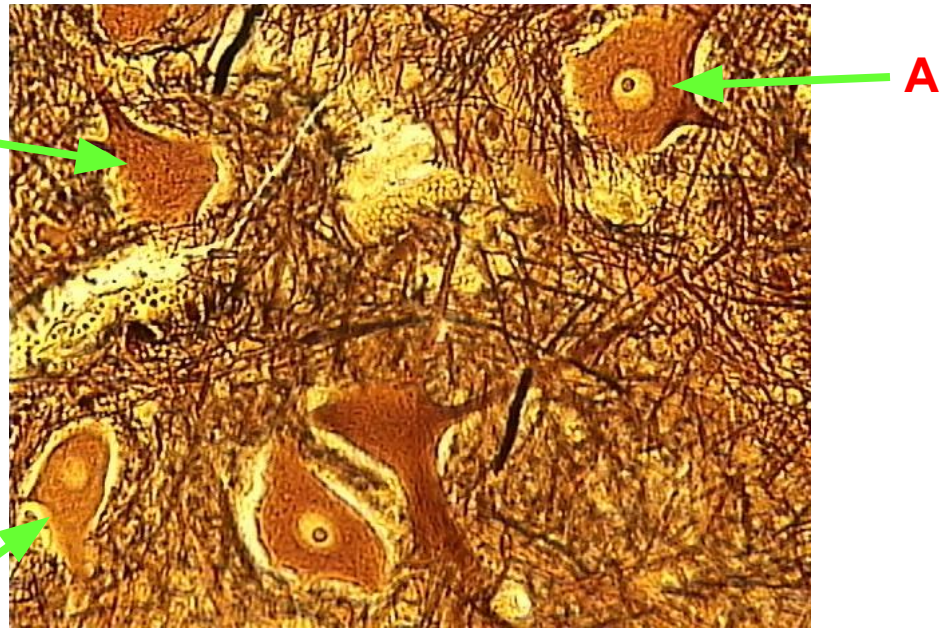
(*из Хэм А., Кормак Д. Гистология: в 5 томах; пер. с англ. – М.: Мир, 1982*):

1. Яйцо
2. Прямые трубки
3. Изогнутые трубки
4. Объект, разделенный перегородками (апельсин)
5. Электрический кабель, состоящий из множества изолированных проводов

назад оглавление далее

Интерпретация формы сечения объекта
(пример 1)





Спинной мозг. Мультиполярные нейроны. Увеличение х280.

Толщина среза 6 мкм. Размеры клеток 100-140 мкм.

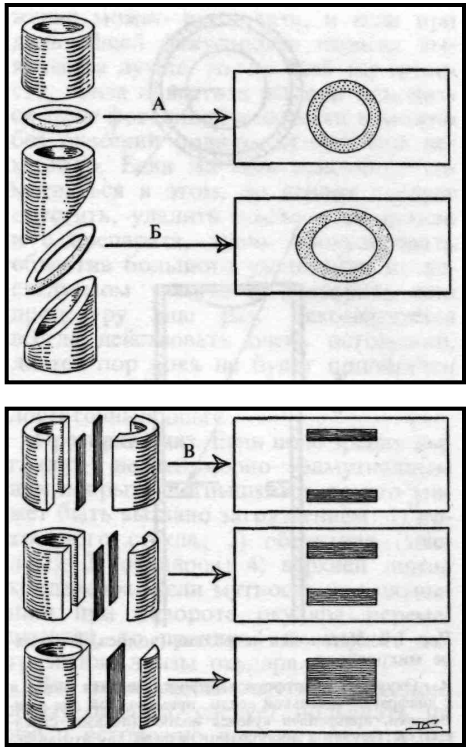
Микрофотография демонстрирует различные участки клеток, попавшие в срез:

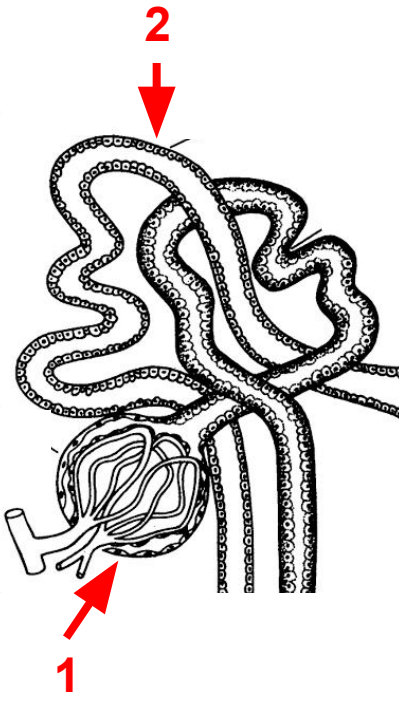
А – цитоплазма, ядро и ядрышко; Б – цитоплазма и ядро;

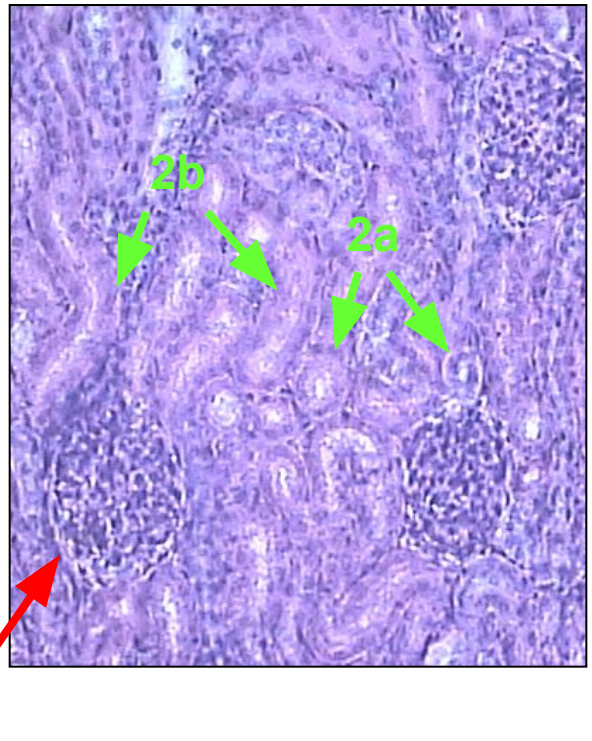
В – только цитоплазма.

назад оглавление далее

Интерпретация формы сечения объекта
(пример 2)







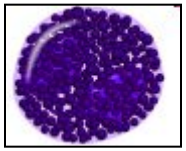
Почка. Корковое вещество. **Увеличение**: х 280

1. Почечное тельце
2. Канальцевая система a. продольные срезы
   b. поперечные срезы

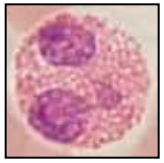
назад оглавление далее

Интерпретация окрашивания клеток и тканей

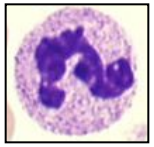
Метахромазия зернистости базофильного гранулоцита



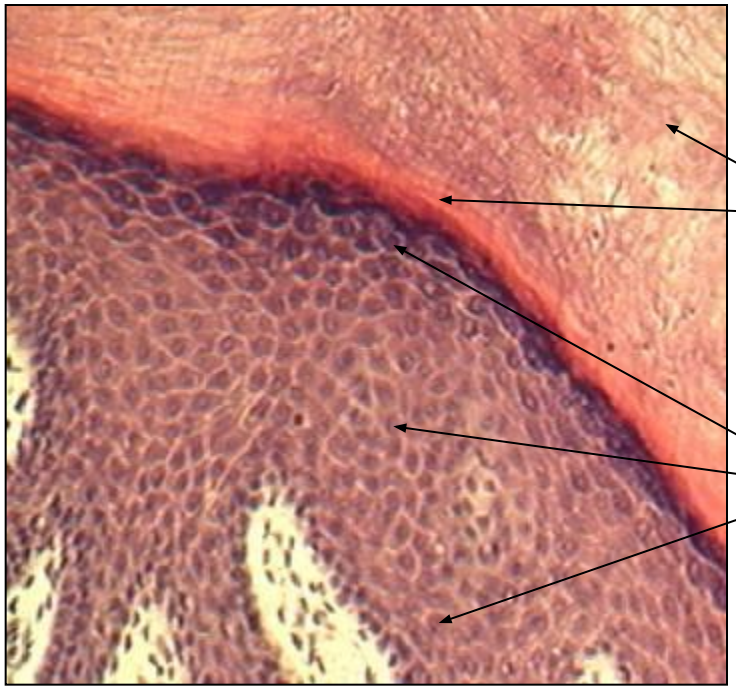
Оксифилия зернистости эозинофильного гранулоцита



Нейтрофилия зернистости нейтрофильного гранулоцита



Зернистые лейкоциты.
Окраска по Романовскому-Гимзе.
Увеличение: х630.



Оксифилия поверхностных слоев

Базофилия глубоких слоев

Многослойный плоский ороговевающий эпителий.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: х56.

Базофилия

Способность окрашиваться ***основными*** (щелочными) красителями называется ***базофилией*** (от греч. basis – основа и philia – любовь).

Основные (щелочные) красители активно связываются со структурами, которые содержат кислоты и несут отрицательный заряд, например, ДНК, РНК.

К ним, в частности, относятся гематоксилин, толуидиновый синий, тионин, метиленовый синий, азуры и др.

Поэтому структуры, связывающие эти красители, называются ***базофильными***.

В клетке базофилией обладает ядро (вследствие высокого содержания ДНК и РНК), иногда цитоплазма (при высоком содержании в ней рибосом или гранулярной ЭПС).

Базофильно может окрашиваться межклеточное вещество некоторых тканей – например, хрящевой.

Метахромазия

Метахромазия (от греч. meta – изменение и chroma – цвет, краска) – изменение цвета некоторых ***основных*** (щелочных) красителей при их связывании со структурами, обладающими специфическими химическими свойствами (обычно высокой концентрацией сульфатированных гликозаминогликанов).

К таким красителям относятся толуидиновый синий, азур II, тионин и др.

Способностью ***метахроматически*** окрашиваться обладают гранулы базофильных лейкоцитов, тучных клеток.

Указанные красители окрашивают другие базофильные структуры в тех же тканях в обычный свойственный им цвет, т.е. ***ортохроматически*** (от греч. orthos – правильный и chroma – краска).

Оксифилия

Способность окрашиваться *кислыми* красителями называется ***оксифилией***, или ***ацидофилией*** (от греч. oxys или лат. acidus – кислый и греч. philia – любовь).

Кислые красители связываются со структурами, имеющими положительный заряд – например, белки.

К таким красителям относятся эозин, оранж G, эритрозин, пикриновая кислота и др.

Структуры, связывающие эти красители, называются ***оксифильными*** или ***ацидофильными***.

Оксифилия свойственна цитоплазме клеток (особенно при высоком содержании в ней митохондрий и некоторых белковых секреторных гранул), эритроцитам (благодаря высокой концентрации в них гемоглобина).

Оксифильно окрашивается цитоплазма кардиомиоцитов, мышечных волокон скелетной мускулатуры, некоторые компоненты межклеточного вещества (например, коллагеновые волокна).

Нейтрофилия

Нейтрофилия (от лат. neutrum – ни тот, ни другой и philia - предрасположение, любовь) – способность гистологических структур окрашиваться и *кислыми*, и *основными* красителями.

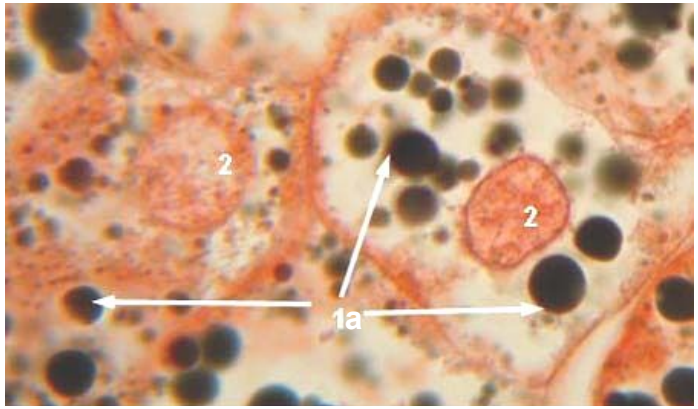
Способностью ***метахроматически*** окрашиваться обладают гранулы нейтрофильных лейкоцитов.

Гисто- и иммуноцитохимические методы

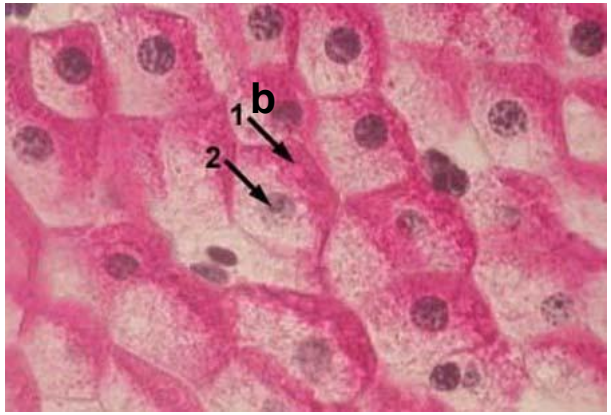
В основе лежит применение химических реакций для выявления распределения химических веществ в структурах клеток, тканей и органов. Современные гистохимические методы позволяют обнаруживать аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты, различные виды углеводов, липидов и др.

Для выявления специфических белков используют иммуноцитохимические реакции. Для этого получают специфические сыворотки, содержащие антитела (например, против белка микротрубочек — тубулина). Далее химическим путем соединяют эти антитела с флюорохромом (или другим маркером). При нанесении меченых антител на гистологический срез они вступают в соединение с соответствующими белками клетки и возникает специфическое свечение, видимое в люминесцентном микроскопе.

Современные иммуноцитохимические методы, помимо флюорохромов, используют другие самые разнообразные специфические маркеры, позволяющие качественно и количественно оценивать содержание в клетке исследуемых соединений.



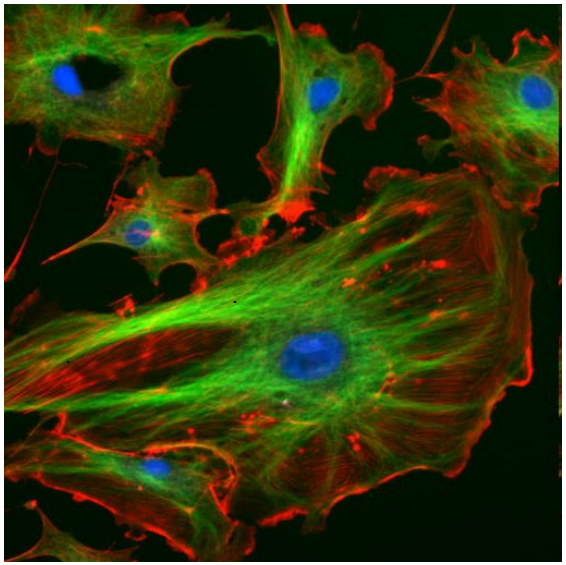
Окраска осмиевая кислота и сафранин



Окраска по Бесту

Клетки печени
1a - включения липидов;
1b – включения гликогена;
2 – ядра

Гисто- и иммуноцитохимические методы (примеры)

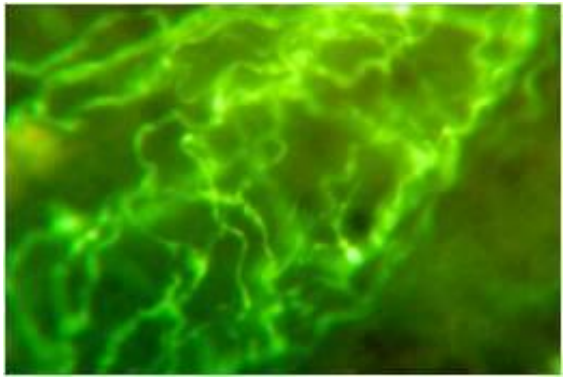


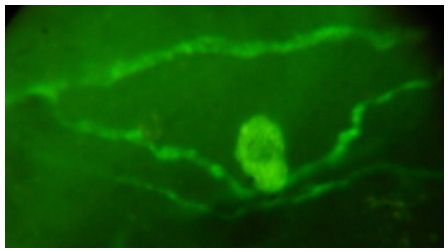
Цитоскелет эукариот

(эндотелиальные клетки быка)

Имунноцитохимический метод окрашивания

Актиновые микрофиламенты окрашены в красный, микротрубочки — в зеленый, ядра клеток — в голубой цвет.

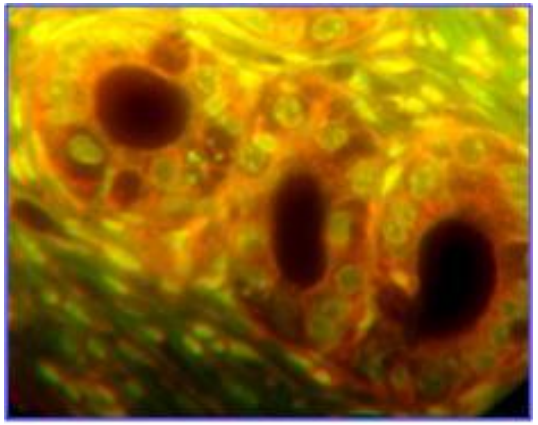




Симпатические нервные сплетения

Гистохимический метод Фалька

Нейромедиаторы в нервных волокнах и клетках окрашены в зеленый цвет.



Нуклеиновые кислоты в эпителии маточных желез

Окраска акридиновым оранжевым

Ядерная ДНК окрашена в зеленый цвет,
РНК – в красный.

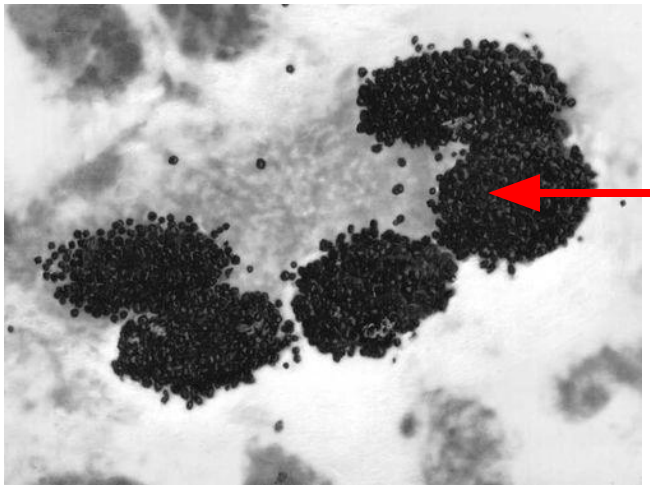
Метод радиоавтографии

Радиоавтография - метод изучения распределения радиоактивных веществ в исследуемом объекте при наложении на объект чувствительной к радиоактивным излучениям фотоэмульсии.

Введение в организм соединений, меченных радиоактивными изотопами, и дальнейшее исследование тканей и клеток позволяет получить точные данные о том, в каких именно клетках или клеточных структурах происходят те или иные процессы, локализуются те или иные вещества, установить временные параметры ряда процессов.

Так, например, применение радиоактивного фосфора дало возможность обнаружить присутствие интенсивного обмена веществ в растущей кости; применение радиоактивных изотопов иода позволили уточнить закономерности деятельности щитовидной железы; введение меченых тритием предшественников нуклеиновых кислот помогли уяснить роль в обмене этих жизненно важных соединений определённых клеточных структур.

Метод радиоавтографии позволяет определить не только локализацию радиоизотопа в биологическом объекте, но и его количество.



Включение в ядра клеток соединительной ткани меченного тритием тимидина, идущего на построение нуклеиновых кислот. Увеличение х 600.

Количественный анализ гистологических препаратов

Денситометрические методы

Основаны на избирательном поглощении различными веществами лучей со строго определенной длиной волны. Интенсивность поглощения света зависит от концентрации вещества (оптической плотности структуры).

- **Цитоспектро-фотометрия**
- **Цитоспектро-флюориметрия**

Морфометрические методы

Описывают метрические свойства морфологических структур в двух- и трехмерной системе, позволяют провести трехмерную реконструкцию объекта

- **Планиметрия** (на плоскости)
- **Стереометрия** (в объеме)

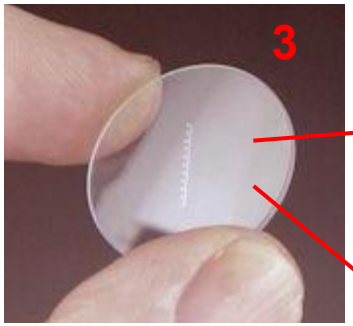
Статистические методы

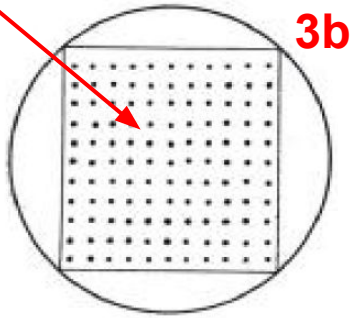
Позволяют установить характер связи между различными признаками, сравнивать объекты одного и разных организмов и т.д.

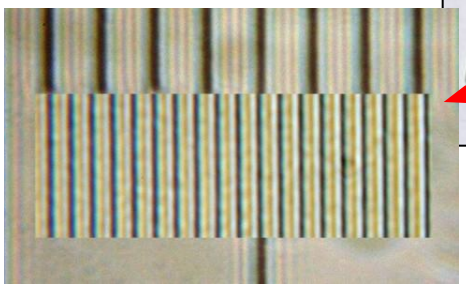
Техническое оснащение морфометрических исследований

Количественный микроскопический анализ проводят на разных уровнях увеличения светового и электронного микроскопов.

В качестве технического оснащения могут быть использованы винтовой окуляр-микрометр (**1**) и объект-микрометр (**2**), окулярные вставки (**3**) для планиметрии и стереометрии, измерительные окулярные линейки (**3a**), квадратно-сетчатые окулярные вставки (**3b**).





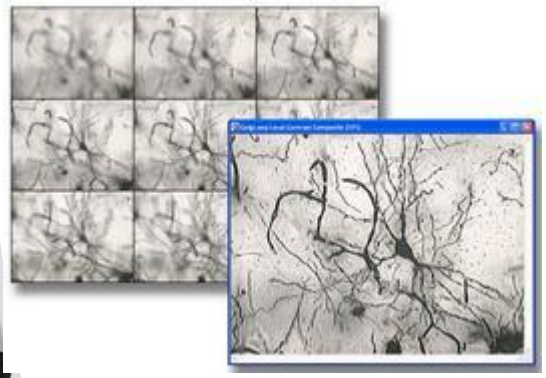


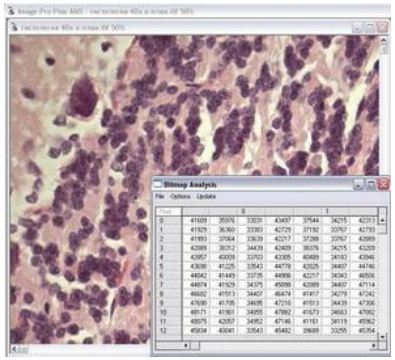
назад оглавление далее

Автоматизация морфометрических исследований

В настоящее время для морфометрических исследований широко используются комплексы автоматизированной микроскопии, объединяющие работу микроскопа, цифровой камеры и компьютерного программного обеспечения в одну общую и простую систему для съемки и анализа изображений.

Широта функций автоматических систем позволяет проводить статистическую обработку и анализ результатов измерений, а также моделирование различных процессов.





назад оглавление далее

Рекомендуемая литература

1. Гистология, цитология и эмбриология: Учебник. / Под ред. Ю.А.Афанасьева, С.Л. Кузнецова, Н.А.Юриной. – М.: Медицина, 2006. – 768 с.
2. Гистология, эмбриология, цитология: Учебник. / Под ред. Э.Г.Улумбекова, Ю.А. Челышева. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2007. – 408 с.
3. Жункейра Л.К., Карнейро Ж. Гистология: Атлас: Уч.пос.; пер. с англ., под ред. В.Л. Быкова. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2009. – 576 с.
4. Хэм А., Кормак Д. Гистология: в 5 томах; пер. с англ. – М.: Мир, 1982.

назад оглавление