Введение в курс гистологии

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТОЛОГИИ КАК НАУКИ

Гистология - наука о микроскопическом и субмикроскопическом строении, развитии и жизнедеятельности тканей животных организмов.

Следовательно, гистология изучает один из уровней организации живой материи тканевой.

Гистология, как учебная дисциплина, включает в себя следующие разделы:

- цитологию;
- эмбриологию;
- общую гистологию (изучает строение и функции тканей);
- частную гистологию (изучает микроскопическое строение органов).

Основная задача гистологии состоит в изучении строения клеток, тканей, органов, установления связей между различными явлениями, установление общих закономерностей.

Исторические этапы развития

В истории развития гистологии условно выделяют три периода:

1. **Домикроскопический период** (с **IV в. до н. э. по 1665 г.**) связан с именами Аристотеля, Галена, Авиценны, Везалия, Фаллопия
2. **Микроскопический период** (**с 1665 г. по 1950 г.**). Начало периода связывают с именем английского физика **Роберта Гука, Ян Пуркинье** описал наличие в животных клетках "протоплазмы" (цитоплазмы) и ядра, а несколько позже **Р. Броун** подтвердил наличие ядра и в большинстве животных клеток.
3. **Ботаник М. Шлейден** заинтересовался происхождением клеток цитогенезисом. Результаты этих исследований позволили **Т. Швану**, на основании их сообщений, сформулировать клеточную теорию (**1838-1839 гг.**) в виде трех постулатов:

- все растительные и животные организмы состоят из клеток;
- все клетки развиваются по общему принципу из цитобластемы;
- каждая клетка обладает самостоятельной жизнедеятельностью,

а жизнедеятельность организма является суммой деятельности клеток

История создания клеточной теории

1590 год. Янсен изобрел микроскоп, в котором увеличение обеспечивалось соединением двух линз

1665 год. Роберт Гук впервые употребил термин клетка.

1**650-1700** годы. Антони Ван Левенгук впервые описал бактерии и другие микроорганизмы.

1827 году Карл Бэр обнаружил яйцеклетку у млекопитающих

1831-1833 годы. Роберт Броун описал ядро в растительных клетках.

1838-1839 годы. Ботаник Матиас Шлейден и зоолог Теодор Шванн объединили идеи разных ученых и сформулировали клеточную теорию, которая постулировала, что основной единицей структуры и функции в живых организмах является клетка.

1855 год. Рудольф Вирхов показал, что все клетки образуются в результате клеточных делений

Исторические этапы развития (продолжение)

Однако вскоре Р. Вирхов **(1858 г.)** уточнил, что развитие клеток осуществляется путем деления исходной клетки (**любая клетка из клетки**). Разработанные Т. Шваном положения клеточной теории актуальны до настоящего времени, хотя формулируются по-иному.

Современные положения клеточной теории:

- клетка является наименьшей единицей живого;
- клетки животных организмов сходны по своему строению;
- размножение клеток происходит путем деления исходной клетки;
- многоклеточные организмы представляют собой сложные ансамбли клеток и их производных, объединенные в системы тканей и органов, связанные между собой клеточными, гуморальными и нервными формами регуляции.

Современный этап развития гистологии

Современный этап развития гистологии начинается **с 1950 г**. с момента начала использования электронного микроскопа для изучения биологических объектов, хотя электронный микроскоп был изобретен раньше (Е. Руска, М. Кноль, 1931 г.). Однако для современного этапа развития гистологии характерно внедрение не только электронного микроскопа, но и других методов:

- цито- и гистохимии;
- гисторадиографии;
- других вышеперечисленных современных методов.

Дальнейшее совершенствование микроскопов, особенно создание ахроматических объективов, позволило выявить в клетках более мелкие структуры:

- клеточный центр Гертвиг, 1875 г.;
- сетчатый аппарат или пластинчатый комплекс Гольджи, 1898 г.;
- митохондрии Бенда, 1898 г.

Основная задача гистологии состоит в изучении:

- строения клеток
- тканей
- органов
- установления связей между различными явлениями
- установление общих закономерностей.

Объекты исследования гистологии

Объекты исследования подразделяются на:

- **живые** (клетки в капле крови, клетки в культуре и другие);
- **мертвые или фиксированные**, которые могут быть взяты как от живого организма (биопсия), так и от трупов.

Гистологический препарат может быть в виде:

- тонкого окрашенного среза органа или ткани;
- мазка на стекле;
- отпечатка на стекле с разлома органа;
- тонкого пленочного препарата.

Приготовление гистологических препаратов

Гистологический препарат любой формы должен отвечать следующим требованиям:

- сохранять прижизненное состояние структур;
- быть достаточно тонким и прозрачным для изучения его под микроскопом в проходящем свете;
- быть контрастным, то есть изучаемые структуры должны под микроскопом четко определяться;
- препараты для световой микроскопии должны долго сохраняться и использоваться для повторного изучения.

требования при приготовлении препарата.

Выделяют следующие этапы приготовления гистологического препарата.

- Взятие материала (кусочка ткани или органа) для приготовления препарата.

При этом учитываются следующие моменты:

- забор материала должен проводиться как можно раньше после смерти или забоя животного, а при возможности от живого объекта (биопсия), чтобы лучше сохранились структуры клетки, ткани или органа;
- забор кусочков должен производиться острым инструментом, чтобы не травмировать ткани;
- толщина кусочка не должна превышать 5 мм, чтобы фиксирующий раствор мог проникнуть в толщу кусочка;
- обязательно производится маркировка кусочка (указывается наименование органа, номер животного или фамилия человека, дата забора и так далее).

Фиксация материала

Фиксация достигается чаще всего погружением кусочка в фиксирующие жидкости, которые могут быть:
- простыми - спирты и формалин и
- сложными растворы - Карнуа, фиксатор Цинкера и другие……

Фиксатор вызывает денатурацию белка и тем самым приостанавливает обменные процессы и сохраняет структуры в их прижизненном состоянии. Фиксация может достигаться также замораживанием **(охлаждением в струе CO2, жидким азотом** и другие). Продолжительность фиксации подбирается опытным путем для каждой ткани или органа.

Этапы приготовления

1. Фиксация (формалин 10%, спирт 70 % -для парафиновой проводки тканей; **глутаровый альдегид -** для электронной микроскопии
2. промывка в водопроводеной воде (при фиксации формалином!!)
3. Обезвоживание в спиртах восходящей концентрации (**с 37% до 96%**)
4. Заливка кусочков в уплотняющие среды – ксилол (или хлороформ)+ спирт 96% (поровну)в термостате при + 37
5. Уплотнение (**парафин, целлоидин, смолы**) или **замораживание** для последующего изготовления тонких срезов.

6. Приготовление срезов на специальных приборах (**микротоме или ультрамикротоме**) с помощью специальных ножей. Срезы для световой микроскопии приклеиваются на предметные стекла, а для электронной микроскопии - монтируются на специальные сеточки.

Окраска срезов

Перед окраской срезов удаляется уплотняющая среда (депарафинизация)- в ксилоле!!. Окраской достигается контрастность изучаемых структур.

Красители

Красители подразделяются на **основные, кислые и нейтральные**. Наиболее широко используются основные красители (обычно гематоксилин) и кислые (эозин). Нередко используют сложные красители. Просветление срезов (в ксилоле, толуоле), заключение в смолы (бальзам, полистерол), закрытие покровным стеклом.

Методы окраски гистосрезов:

- **Ядерные (основные):**
- гематоксилин – окрашивает ядра **в синий цвет**;
- железный гематоксилин;
- азур II (**в фиолетовый**);
- кармин (**в красный**);
- сафранин (**в красный**);
- метиловый синий (**в синий**);
- толуидиновый (**в синий**);
- тиониновый (**в синий**).

- **Цитоплазматические-(кислые):**
- эозин – в розовый;
- эритрозин;
- оранжевый «G»;
- кислый фуксин –в красный;
- пикриновая кислота - в желтый;
- конго –красный – в красный

СПЕЦИАЛЬНЫЕ Методы окраски гистосрезов

- **Судан III –окраска липидов и жиров в оранжевый цвет;**
- **осмиевая кислота – окраска липидов и жиров в черный цвет;**
- **орсеин -окраска эластических волокон в коричневый цвет;**
- **азотнокислое серебро – импрегнация нервных элементов в темно-коричневый цвет.**

Окраска гистосрезов

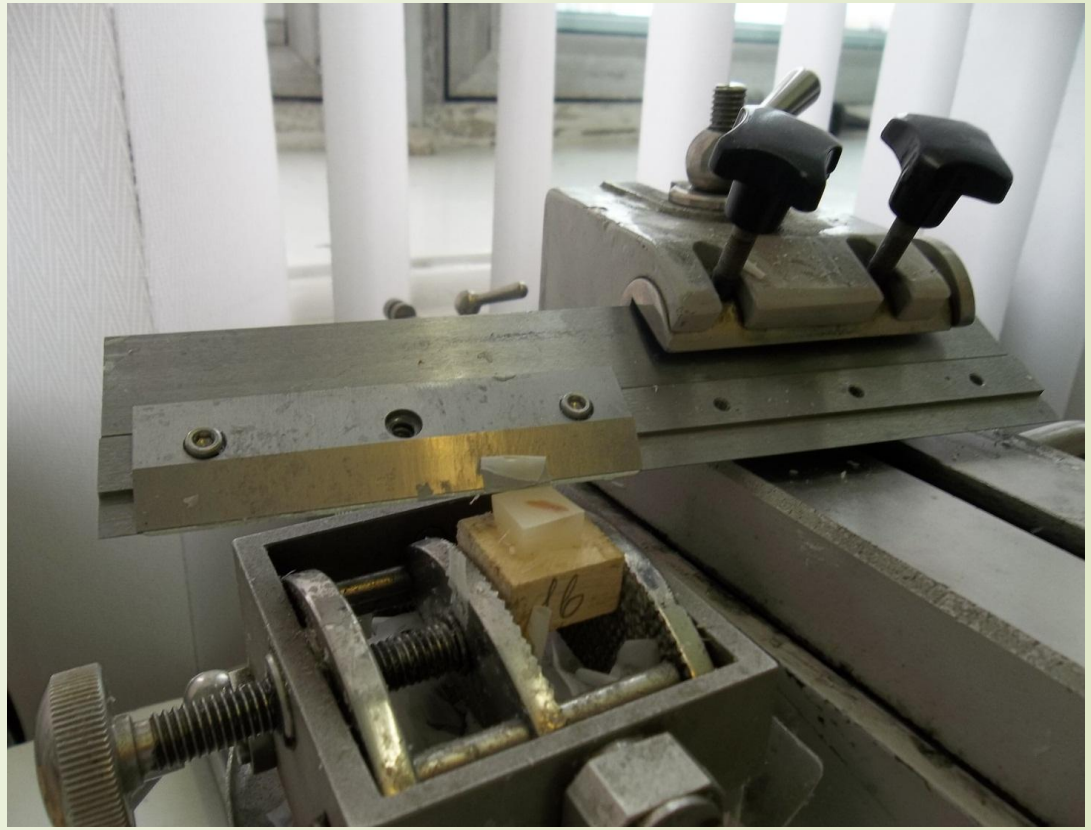
ОКСИФИЛИЯ-
способность окрашиваться кислыми красителями в розовый цвет

Базофилия-
способность окрашиваться основными красителями в синий цвет
Нейтрофилия –
способность окрашиваться кислыми и основными красителями в фиолетовый цвет.

КАБИНЕТ ГИСТОЛОГИИ

ТЕРМОСТЫ t +60, t+37

МИКРОТОМ - РОТАЦИОННЫЙ



ПОЛУЧЕННЫЕ ГИСТОСРЕЗЫ

Методы исследования

Основным методом исследования биологических объектов, используемым в гистологии является **микроскопирование**, т. е. изучение гистологических препаратов под микроскопом.

Микроскопия может быть самостоятельным методом изучения, но в последнее время она обычно сочетается с другими методами (гистохимии, гисторадиографии и другие).

Следует помнить, что для микроскопии используются разные конструкции микроскопов, позволяющие изучить разные параметры изучаемых объектов

Различают следующие виды микроскопии:

- ***световая микроскопия*** (разрешающая способность 0,2 мкм) наиболее распространенный вид микроскопии;
- ***ультрафиолетовая микроскопия*** (разрешающая способность 0,1 мкм);
- ***люминесцентная*** (флюоресцентная) микроскопия для определения химических веществ в рассматриваемых структурах;
- ***фазово-контрастная микроскопия*** для изучения структур в неокрашенных гистологических препаратах;
- ***поляризационная микроскопия*** для изучения, главным образом, волокнистых структур;
- ***микроскопия в темном поле*** для изучения живых объектов;
- ***микроскопия в падающем свете*** для изучения толстых объектов;
- ***электронная микроскопия*** (разрешающая способность до 0,1-0,7 нм), две ее разновидности просвечивающая *(трансмиссионная)* электронная микроскопия и сканирующая или *растровая микроскопии* дает отображение поверхности ультраструктур.

Единицы измерения, используемые в гистологии

Для измерения структур в световой микроскопии используются в основном микрометры:
- 1 мкм составляет 0,001 мм;
в электронной микроскопии используются нанометры:
- 1 нм составляет 0,001 мкм.

Окуляр
Макрометрический винт
Микрометрический винт
Объектив
Предметное стекло со срезами
Конденсор
Зеркало

Микроскопы

фазовоконтрастный микроскоп -для изуч. живых неокраш-х обьектов

темнопольный микроскоп

темнопольный микроскоп (для изуч. живых неокраш-х обьектов). Темнопольная микроскопия позволяет наблюдать живые объекты.

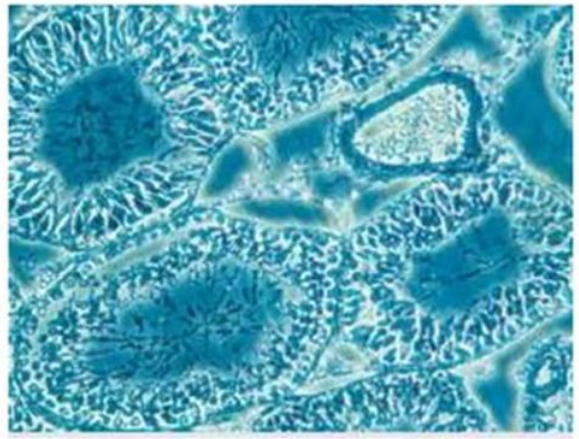
Фазово-контрастная микроскопия

Метод служит для получения контрастных изображений прозрачных и бесцветных объектов, в частности, позволяет изучать живые неокрашенные препараты.

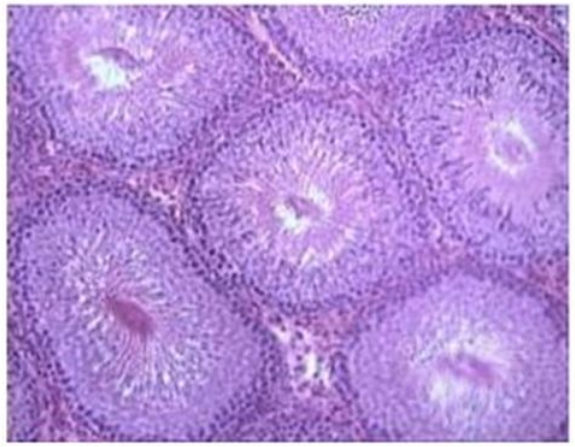
Даже при очень малых различиях в показателях преломления разных элементов препарата световая волна, проходящая через них, претерпевает разные изменения по фазе (приобретает **фазовый рельеф**). Эти фазовые изменения, не воспринимаемые глазом, преобразуются с помощью специального оптического устройства (**кольцевой диафрагмы** в конденсоре и **фазовой пластинки** в объективе) в изменения амплитуды световой волны, т. е. в изменения яркости («**амплитудный рельеф**»), которые уже различимы глазом.

Иными словами, в получаемом видимом изображении распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным.

Pseudotrichonympha grassi.
Неокрашенный препарат.
Фазовый контраст



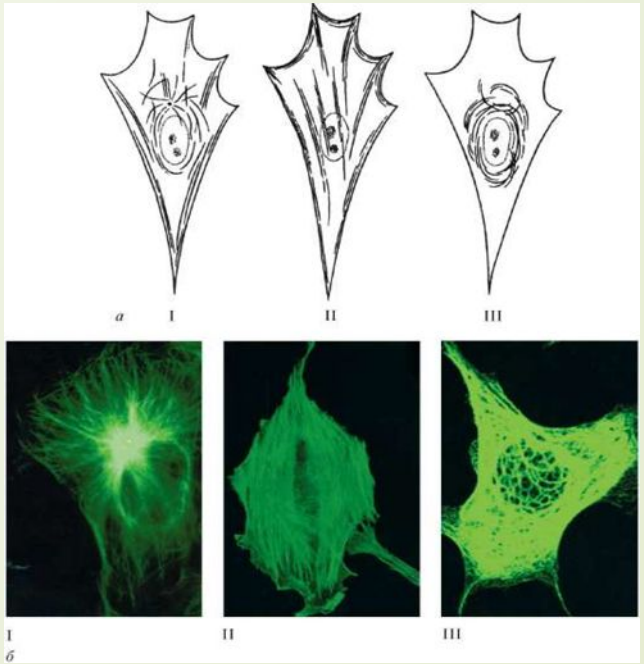
Семенники крысы.
Неокрашенный препарат.
Фазовый контраст



Семенники крысы.
Окраска: гематоксилин-эозин
Световая микроскопия

Микроскопы

Флюоресцентный (люминесцентный) микроскоп - предназначенный для изучения свойств органических или неорганических веществ с использованием явления флуоресценции (люминесценции), позволяющий визуализировать невидимые в обычном свете микрообъекты, за счёт их люминесценции.



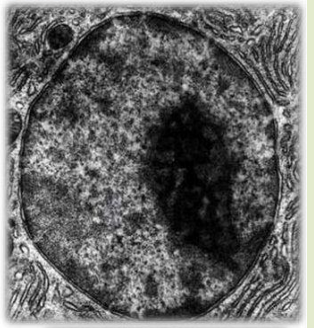
Сканирующее электронно-зондовые микроскопы

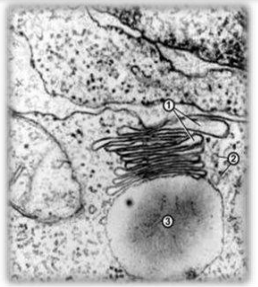
Сканирующее электронно-зондовые микроскопы (СЭЗМ) сканируют поверхность исследуемого образца при помощи зонда или щупа в виде крошечной металлической иголки.

II. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия

- Электронная микроскопия дает в **100** раз большее разрешение биологических объектов по сравнению со световой микроскопией.
- В электронном микроскопе изображение строится с помощью узкого пучка электронов, с высокой скоростью проходящего через срез ткани и взаимодействующего с ним.





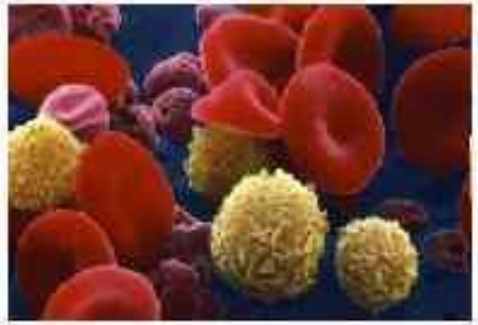
Электро́нный микроско́п (ЭМ) — прибор, позволяющий получать изображение объектов с максимальным увеличением до 10^6 раз, благодаря использованию, в отличие от оптического микроскопа, вместо светового потока, пучка электронов с энергиями 200 эВ — 400 кэВ и более (например, просвечивающие электронные микроскопы высокого разрешения с ускоряющим напряжением 1 МВ).

Обычный электронный микроскоп

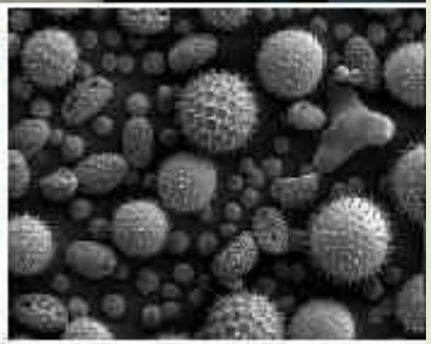
Комплекс Гольджи

Митохондрия

Растровый (сканирующий) электронный микроскоп (увеличение от 100 до млн раз)



Клетки крови



Пыльца растений

МИКРОСКОП – БИОЛОМ

Автомат для проводки тканей MTM производства SLEE medical (Германия)

Система для заливки тканей MPS P1 производства SLEE medical (Германия)

Электрический автоматический микротом CUT 6062 производства SLEE medical (Германия)

Автоматический мультистейнер MAS производства SLEE medical (Германия)

(для окраски гистосрезов)

Устройство для заморозки образцов MTR производства SLEE medical (Германия)

(это для иммуногистохимии нужен!)

Настольный механический криостат MTC производства SLEE medical (Германия)

(А это для резки замороженных тканей)