

Ивановская государственная медицинская академия
Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии

1

Методы исследования в гистологии, цитологии и эмбриологии Часть I

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

[далее](#)

Оглавление

Введение

Методы исследования живых клеток и тканей

Виды гистологических препаратов фиксированных клеток

Изготовление гистологического препарата

Гистологический препарат

Взятие материала

Фиксация материала

Уплотнение материала

Приготовление срезов

Виды микротомов

Окрашивание срезов

Методы окрашивания

Типы красителей

Заключение срезов в консервирующую среду

Методы микроскопии

Световая микроскопия

Устройство светового микроскопа

Техника микроскопирования

Темнопольная микроскопия

Поляризационная микроскопия

Фазово-контрастная микроскопия

Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия

Электронная микроскопия

Рекомендуемая литература

назад

далее

Введение

В современной гистологии, цитологии и эмбриологии применяются разнообразные методы исследования, позволяющие всесторонне изучать процессы развития, строения и функции клеток, тканей и органов.

Главными этапами цитологического и гистологического анализа являются

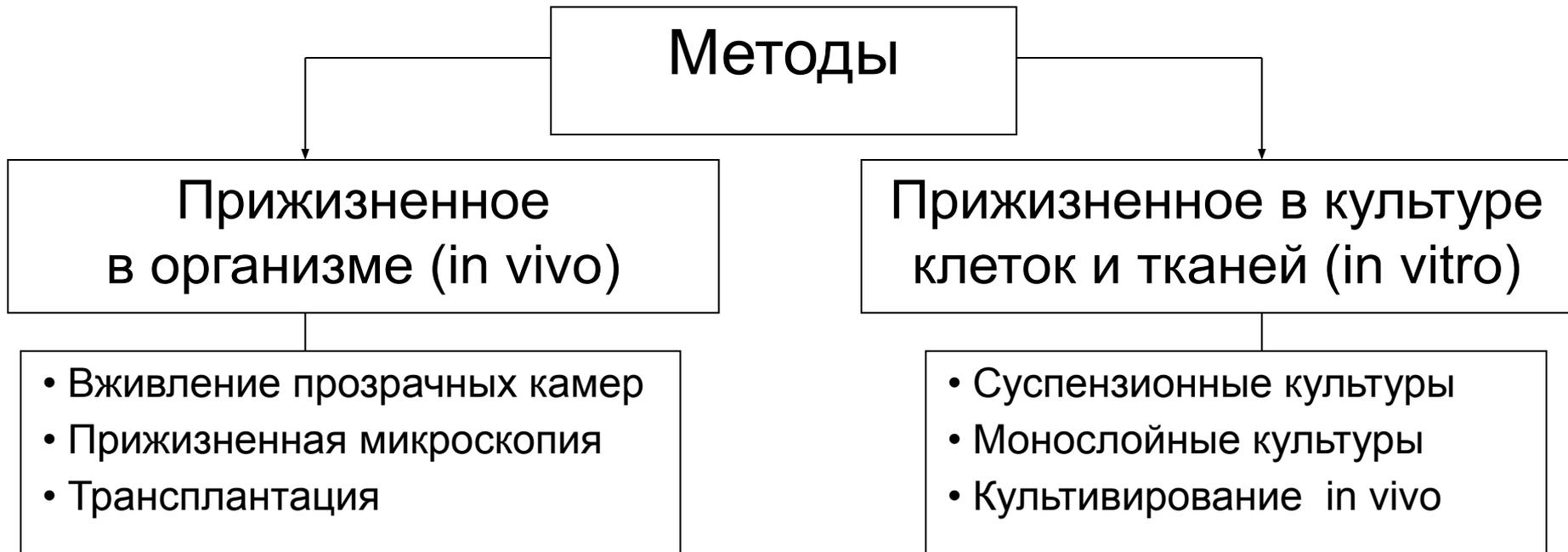
- выбор объекта исследования
- [подготовка его к микроскопированию](#)
- [применение методов микроскопирования](#)
- качественный и количественный анализ изображения

Объектами исследования служат [гистологические препараты](#) Объектами исследования служат гистологические препараты, изготовленные из [живых](#) Объектами исследования служат гистологические препараты, изготовленные из живых или [фиксированных клеток](#).

[оглавление](#) [далее](#)

Методы исследования живых клеток и тканей

Изучение живых клеток и тканей позволяет получить наиболее полную информацию об их жизнедеятельности – проследить процессы движения, деления, разрушения, роста, дифференцировки и взаимодействия клеток, продолжительность их клеточного цикла, реактивные изменения в ответ на действие различных факторов.



Виды гистологических препаратов фиксированных клеток

Срез

- тонкие (толщина более 1 мкм)
- полутонкие (толщина менее 1 мкм)
- ультратонкие (толщина менее 0,1 мкм)

Мазок

- крови
- красного костного мозга
- спинно-мозговой жидкости
- слюны
- влагалищный
- и др.

Отпечаток

- селезенки
- тимуса
- печени
- слизистой оболочки мочевого пузыря
- слизистой оболочки щеки
- и др.

Пленка

- брюшины
- плевры
- мягкой мозговой оболочки
- соединительной ткани
- и др.

Изготовление гистологического препарата



Гистологический препарат

Гистологические препараты, как правило, представляют собой срезы (толщиной 5-15 мкм) органов, тканей или клеток, окрашенные специальными гистологическими красителями.

Гистологический препарат 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.

Процесс изготовления гистологического препарата включает следующие основные этапы:

1. Взятие и фиксация материала
2. Уплотнение материала
3. Приготовление срезов
4. Окрашивание срезов
5. Заключение срезов в прозрачную среду

Взятие материала

Изготовление гистологического препарата производится из органов и тканей, полученных несколькими путями:

- биопсия (пунктат),
- операционным путем,
- секционный (трупный) материал,
- экспериментальный

При этом должны учитываться следующие моменты:

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

Фиксация материала

Цель фиксации материала – сохранение прижизненной морфологии клеток и тканей, предотвращение аутолиза и посмертных изменений.

Фиксатор вызывает денатурацию белка и стабилизацию липидов и тем самым приостанавливает обменные процессы и сохраняет структуры в их прижизненном состоянии.

Фиксация достигается чаще всего погружением кусочка в фиксирующие жидкости, которые могут быть простыми (формалин, спирты, глутаровый альдегид, ацетон) и сложными (раствор Карнуа, фиксатор Ценкера и др.).

Фиксация может достигаться также замораживанием (охлаждением в струе CO_2 , жидким азотом и др.).

Подбор фиксаторов и продолжительность фиксации индивидуален для различных органов и тканей и обычно колеблется от 2 до 24 часов.

Уплотнение материала

Целью этого этапа является придание исследуемому материалу такой плотности, которая позволит получить тонкие срезы необходимой толщины.

Этого достигают двумя способами:

- Замораживание образца с последующей резкой на замораживающем микротоме.
- Пропитывание уплотняющими средами (парафин, эпоксидные смолы и др.)

Основные этапы парафиновой проводки:

- Промывка материала проточной водопроводной водой для удаления фиксатора.
- Обезвоживание (дегидратация) материала в спиртах увеличивающейся концентрации (70, 80, 90, 96, абсолютный – 100%).
- Удаление спирта и подготовка материала к пропитыванию парафином обработкой растворителями парафина (ксилол и др.) и смесью парафина и ксилола (при температуре 37°C)
- Заливка в чистый расплавленный парафин (при температуре 56°C).
- Охлаждение парафина и формирование блоков.

Приготовление срезов

Для изготовления тонких срезов заданной толщины в настоящее время используются специальные приборы – [микротомы](#) (для световой микроскопии) и ультрамикротомы (для электронной микроскопии).

Специальные ножи микротомов позволяют получить срезы толщиной:

- 3-8 мкм из материала, залитого в парафин,
- 10-25 мкм из материала, замороженного в камере микротом-криостата
- 0,08-0,1 мкм из материала, подготовленного для электронной микроскопии

Полученные срезы помещают на предметные стекла (для световой микроскопии) или монтируются на специальные сеточки (для электронной микроскопии).

Виды микротомов

санный

ротационный

криостатный

замораживающий

для экспресс-диагностики, гистохимии

вибротом

изготовление срезов фиксированных и нефиксированных тканей



изготовление парафиновых срезов



изготовление серийных парафиновых срезов



изготовление срезов при температуре -20°C и ниже для гистохимии и иммуноцитохимии

Окрашивание срезов

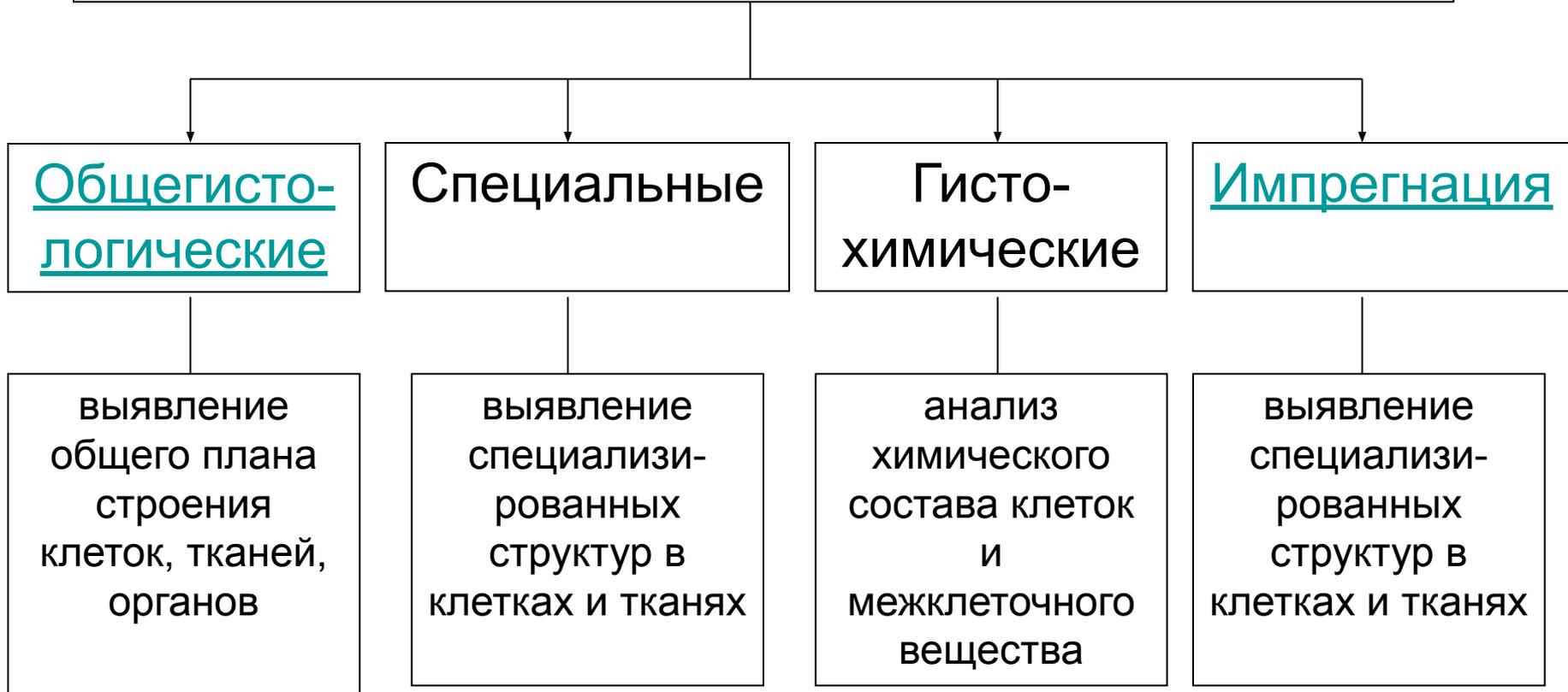
Клеточные структуры без специальной обработки, как правило, не различимы даже при большом увеличении микроскопа. Они бесцветны и прозрачны.

Для выявления тканевых компонентов, отдельных клеток, внутриклеточных структур используют [красители](#) – вещества с высоким сродством к различным компонентам ткани и с определенными цветооптическими свойствами.

Способность тканевых компонентов по-разному окрашиваться зависит от кислотно-основных (щелочных) свойств веществ, входящих в их состав.

Перед окрашиванием срезы депарафинируют, проводя последовательно через растворитель парафина (ксилол), спирты нисходящей концентрации (100, 96, 90, 80, 70%) и помещают в воду.

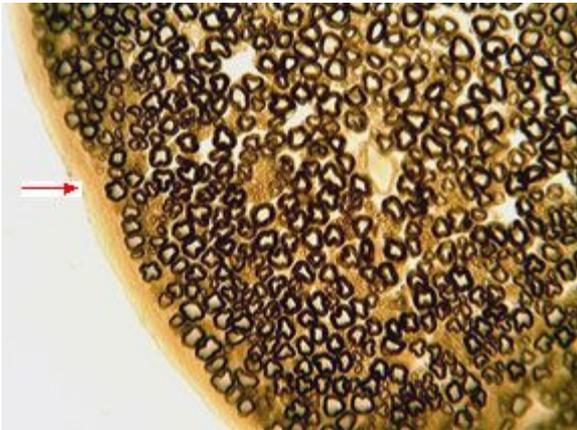
Методы окрашивания



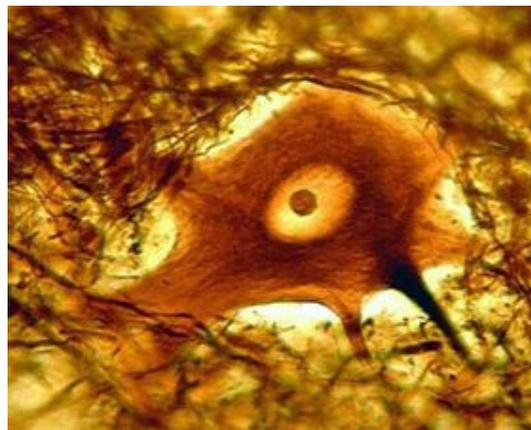
Импрегнация

Метод выявления тканевых структур путем пропитывания объектов гистологического исследования растворами солей тяжелых и драгоценных металлов (например, азотнокислое серебро (серебрение), кобальт, хлористое золото (золочение), кадмий, осмиевым ангидрид и др.).

Участки ткани, в которых происходит осаждение солей металлов на гистологических структурах, приобретают черный или бурый цвет в зависимости от количества и свойств восстановленного металла.



Периферический нерв
(поперечный срез).
Импрегнация оксидом осмия



Мультиполярный нейрон.
Импрегнация нитратом серебра



Мультиполярные нейроны.
Импрегнация нитратом серебра

Типы общегистологических красителей

ОСНОВНЫЕ

ОСНОВАНИЯ, СВЯЗЫВАЯСЬ С КИСЛОТНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР, ВЫЗЫВАЮТ ОБЫЧНО ИХ ОКРАШИВАНИЕ В СИНЕ-ФИОЛЕТОВЫЕ ЦВЕТА

[базофилия](#)

[метахромазия](#)

нейтральные

содержат как основные, так и кислые красящие компоненты

[нейтрофилия](#)

КИСЛЫЕ

соединяясь с основными (щелочными) соединениями гистологических структур, окрашивают их в цвета красителя

[оксифилия](#)

Базофилия

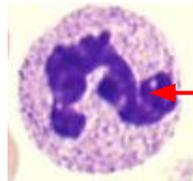
Основные (щелочные) красители активно связываются со структурами, которые содержат кислоты и несут отрицательный заряд – например, ДНК, РНК.

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

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

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.



Базофилия ядра
нейтрофильного гранулоцита.

Окраска по Романовскому-Гимзе.

Увеличение: x630.

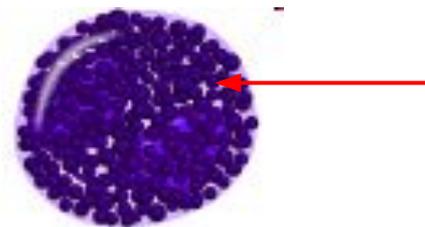
Метахромазия

Метахромазия (от греч. meta – изменение и chroma – цвет, краска) – изменение цвета некоторых *основных 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.

Способность *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).



Метахромазия зернистости
базофильного гранулоцита.
Окраска по Романовскому-Гимзе.
Увеличение: x630.

Оксифилия

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

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

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

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).



Оксифилия зернистости
эозинофильного гранулоцита.

Окраска по Романовскому-Гимзе.

Увеличение: x630.

Нейтрофилия

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



Нейтрофилия зернистости
нейтрофильного гранулоцита.

Окраска по Романовскому-Гимзе.

Увеличение: х630.

Заключение срезов в консервирующую среду

Окрашенные гистологические препараты обезвоживаются в спиртах восходящей концентрации (70, 80, 90, 96, абсолютный – 100%) и просветвляются в ксилоле, бензоле, толуоле или некоторых маслах.

Для длительного хранения обезвоженный гистологический срез заключают (монтируют) в прозрачную консервирующую среду (смолу хвойных деревьев – канадский, пихтовый бальзам, а также в синтетические среды).

На постоянном гистологическом препарате срез ткани располагается на предметном стекле, сверху закрыт покровным стеклом. Между стеклами (предметным и покровным) находится заливочная среда, обладающая коэффициентом преломления световых лучей, близким к таковому у стекла.

A microscopic image of a plant stem cross-section, showing vascular bundles arranged in a ring. Each bundle contains xylem on the inner side and phloem on the outer side. The text "Методы микроскопии" is overlaid in red.

Методы микроскопии

Методы микроскопии

Оптическая

Световая

Поляриза-
ционная

Флюоресцентная
(люминесцентная)

Темно-
польная

Фазово-
контраст-
ная

Электронная

Просвечивающая
(трансмиссионная)

Сканирующая
(растровая)

Световая микроскопия

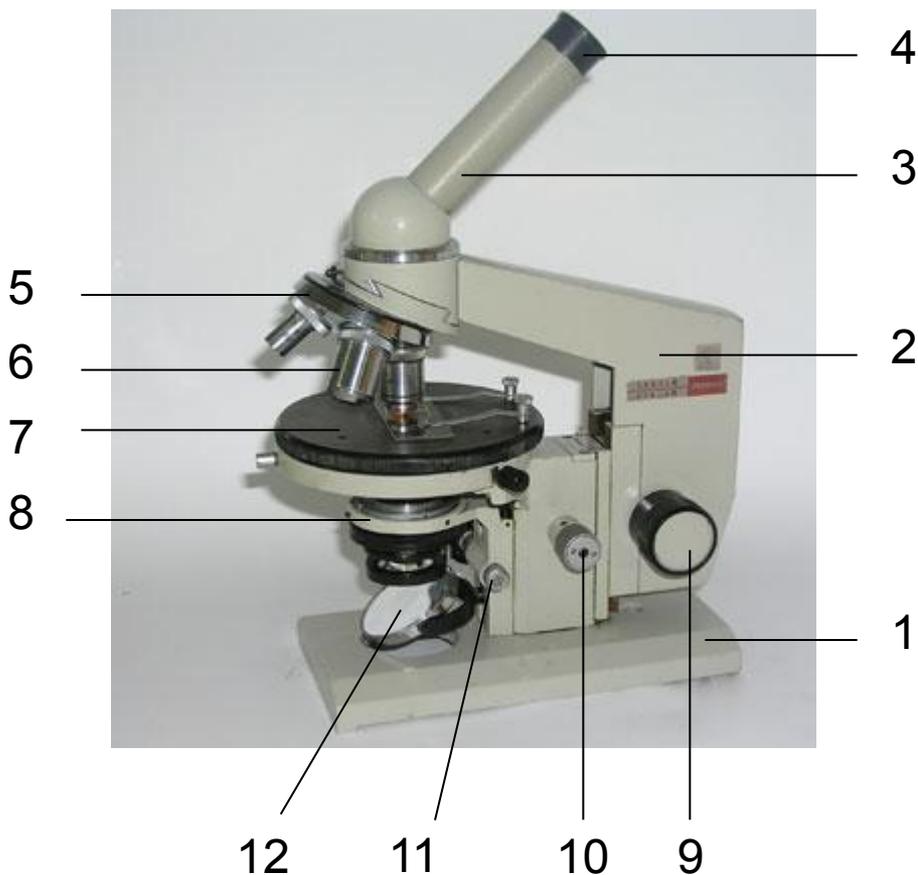
Изучение гистологического препарата осуществляется в проходящем свете с помощью [светового микроскопа](#).

Источник света естественный или искусственный (различные лампы). Свет собирается в [конденсор](#) Источник света естественный или искусственный (различные лампы). Свет собирается в конденсор и далее направляется через препарат в [объектив](#) Источник света естественный или искусственный (различные лампы). Свет собирается в конденсор и далее направляется через препарат в объектив. [Окуляр](#) дополнительно увеличивает это изображение.

Качество изображения (четкость) определяется **разрешающей способностью микроскопа**, т.е. минимальным (разрешающим) расстоянием, на котором оптика микроскопа позволяет различить раздельно две близко расположенные точки. Эта величина пропорциональна длине световой волны и для обычного светового микроскопа равна приблизительно 0,2 мкм. Чем меньше разрешающее расстояние, тем выше разрешающая способность микроскопа и тем более мелкие объекты можно исследовать.

Увеличение микроскопа – это соотношение между истинными размерами исследуемого объекта и размерами его изображения, получаемого с помощью микроскопа. [Назад](#) [оглавление](#) [далее](#)

Устройство светового микроскопа

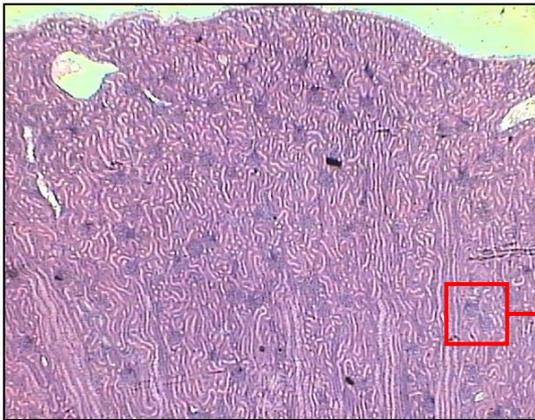


Общее увеличение микроскопа = увеличение объектива \times увеличение окуляра

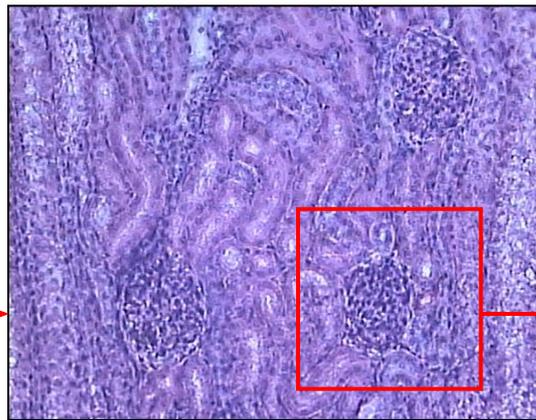
Техника микроскопирования

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 x8), 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 x40).
6. С помощью [револьверного устройства](#) ставят объектив с более сильным увеличением (x40). **Установку резкости** проводят с помощью [микровинта](#).
7. Для изучения очень мелких гистологических структур используют [иммерсионный объектив](#) (x90).
 - 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.

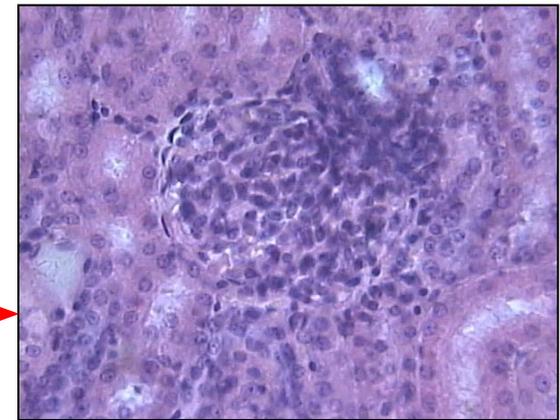
Техника микроскопирования (примеры)



Почка.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: x 56
(*малое увеличение*).



Почка.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: x 280
(*большое увеличение*).



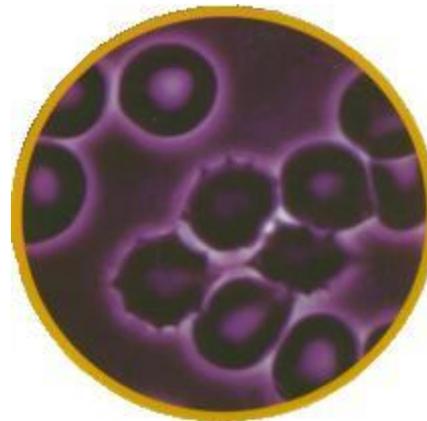
Почка.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: x 630
(*иммерсионное увеличение*).

Темнопольная микроскопия

Основана на использовании специального конденсора, освещающего препарат «косыми» лучами, не попадающими в объектив.

При наличии объекта в поле зрения свет отражается от него и направляется в объектив.

Метод часто используется для изучения живых неокрашенных клеток.



Поляризационная микроскопия

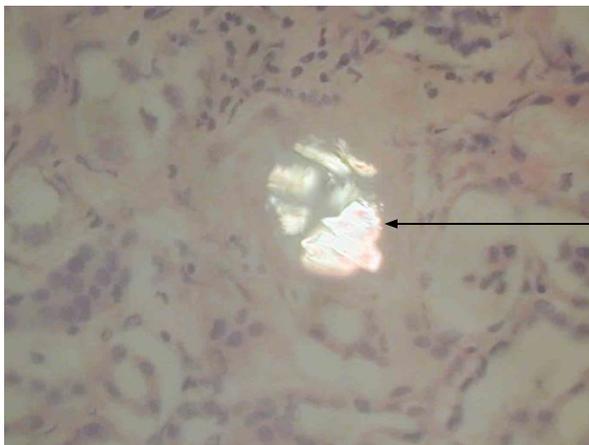
Позволяет обнаружить двойное лучепреломление – анизотропию.

На объект исследования направляется поляризованный пучок света, т.е. лучи света направлены строго в одной плоскости.

Это обеспечивает особый фильтр – поляризатор. Такой свет направляется на объект исследования.

Второй фильтр – анализатор расположен между объективом и окуляром и позволяет регистрировать угол отклонения плоскости поляризации света.

Микроскопия позволяет регистрировать пространственное расположение молекул в объективе или кристаллические структуры.



**Кристаллы оксалатов.
Поляризационная
микроскопия.
Увеличение x100**

Фазово-контрастная микроскопия

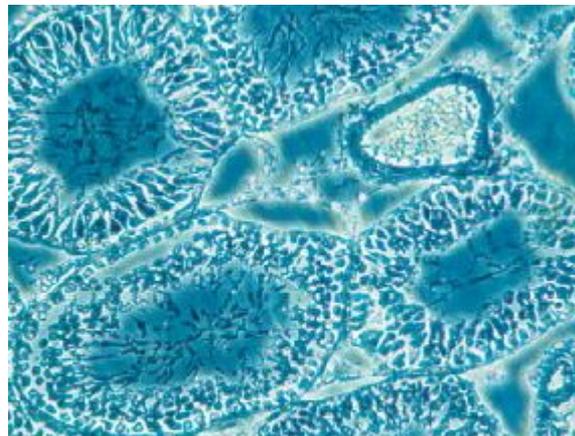
Метод служит для получения контрастных изображений прозрачных и бесцветных объектов, в частности, позволяет изучать живые неокрашенные препараты.

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.

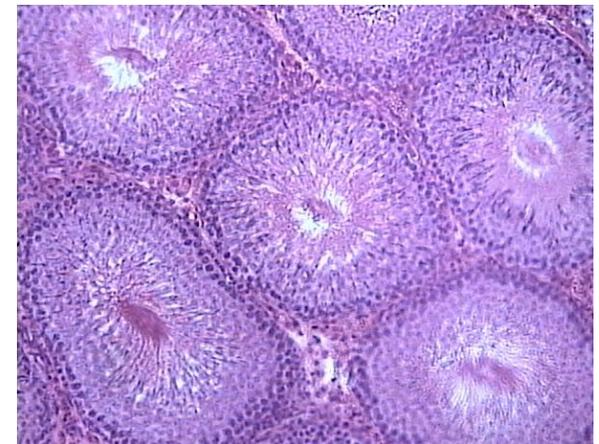
Иными словами, в получаемом видимом изображении распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным.



Pseudotriconympha grassi.
Неокрашенный препарат.
Фазовый контраст



Семенники крысы.
Неокрашенный препарат.
Фазовый контраст



Семенники крысы.
Окраска: гематоксилин-эозин
Световая микроскопия

Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия

Использует принцип свечения объекта исследования при освещении его ультрафиолетовыми лучами. Источником света служат специальные лампы.

Существует аутофлюоресценция – собственная или первичная флюоресценция. Например, свечение эластических волокон в стенке артерий.

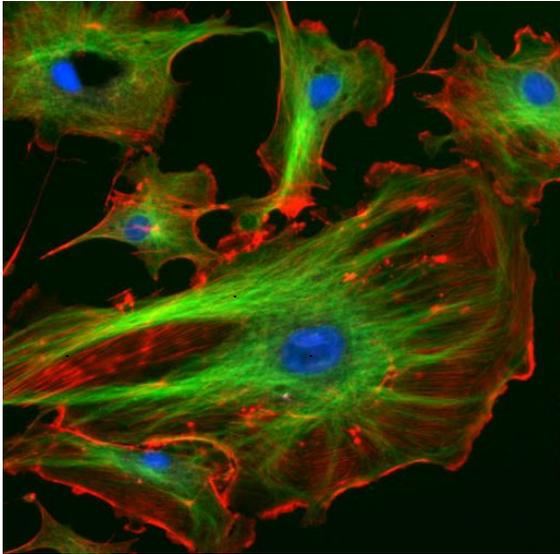
Вторичная флюоресценция возникает после обработки препаратов специальными красителями – флюорохромами (акридин оранжевый, родамин, флюоресцин и др.).

Например: после обработки акридиновым оранжевым Например: после обработки акридиновым оранжевым в клетке очень четко обнаруживается ядерная ДНК (ярко-зеленое свечение) и РНК (ярко-красное свечение). После фиксации тканей в парах формальдегида (метод Фалька) обнаруживается ярко-зеленое свечение серотонина, катехоламинов (адреналин, норадреналин).

Если флюоресцентные красители связать со специфическими антителами – можно будет выявить их антигены. Этот метод получил название ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО.

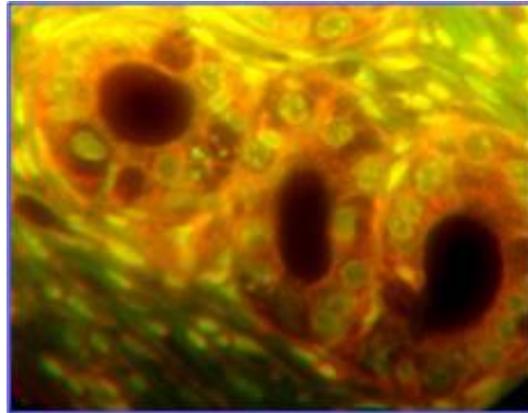
[назад](#) [оглавление](#) [далее](#)

Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия (примеры)



Цитоскелет эукариот
(эндотелиальные клетки быка).
Имуноцитохимический метод
окрашивания.

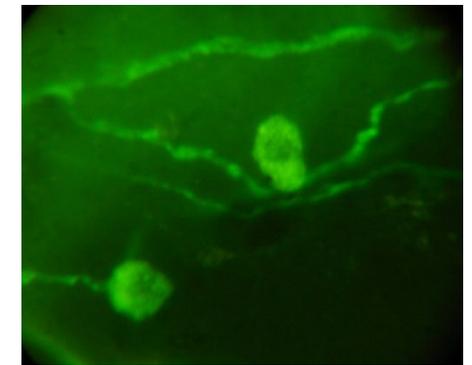
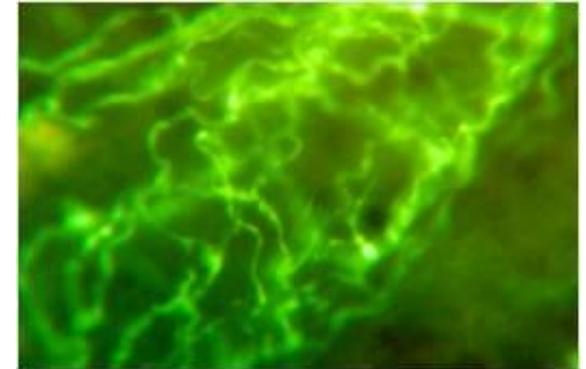
Актиновые микрофиламенты
окрашены в красный,
микротрубочки — в зеленый, ядра
клеток — в голубой цвет.



Нуклеиновые кислоты
в эпителии маточных
желез.

Окраска акридиновым
оранжевым.

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



Симпатические
нервные сплетения.
Метод Фалька

Электронная микроскопия

Электронный микроскоп — прибор, позволяющий получать изображение объектов с максимальным увеличением до 10^6 раз. Это стало возможно благодаря использованию вместо светового потока **пучка электронов**, длина волны которого во много раз короче длины волны **фотонов видимого света**.

Электронный микроскоп состоит из **электронной пушки** (устройства для получения пучка электронов) и системы **электромагнитных линз**, размещенных в колонне микроскопа в условиях вакуума.

Разрешающая способность электронного микроскопа в $1000 \div 10000$ раз превосходит разрешение светового микроскопа и для лучших современных приборов может составлять менее $0,1 \text{ нм}$ (10^{-10} м).

Существуют две основные разновидности электронной микроскопии: [трансмиссионная](#) (просвечивающая) и [сканирующая](#) (растровая).

Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия

Принцип работы трансмиссионного электронного микроскопа заключается в том, что электроны, проходя через объект, расположенный вблизи объективной линзы, взаимодействуют с его атомами и отклоняются от первоначального направления падения пучка (рассеиваются). Далее они попадают в систему магнитных линз, которые формируют на флуоресцентном экране (и на фотопленке) изображение внутренней структуры объекта. При этом удается достичь разрешения порядка 0,1 нм, что соответствует увеличениям до $1,5 \cdot 10^6$ раз.

Разрешение и информативность ТЭМ-изображений во многом определяются характеристиками объекта и способом его подготовки. Для получения контрастного изображения применяют ультратонкие срезы (не более 0,01 мкм), обработанные соединениями тяжелых металлов (импрегнация солями свинца, урана, осмия и др.), избирательно взаимодействующими с компонентами микроструктуры (химическое контрастирование). При этом чем большей рассеивающей способностью обладает участок исследуемого объекта (участки повышенной плотности, увеличенной толщины и пр.), тем более темным будет его [изображение](#).

Сканирующая (растровая) электронная микроскопия

Принцип работы сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) заключается в сканировании поверхности образца сфокусированным электронным пучком и анализе отраженных от нее частиц и рентгеновского излучения, возникающего в результате взаимодействия электронов с веществом.

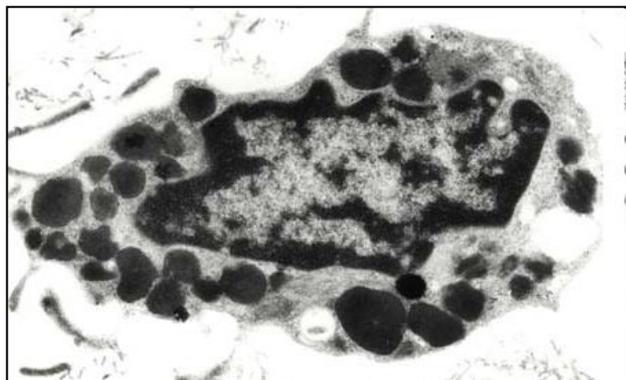
В СЭМ пучок электронов (электронный зонда) фокусируется электромагнитными линзами конденсора и объектива. Специальное устройство – дефлектор отклоняет электронный пучок (первичные электроны), который скользит по поверхности (растр). Вторичные электроны (отраженные от поверхности) воспринимаются детектором и фокусируются на экране СЭМ, создавая ее [трехмерное изображение](#).

Современный СЭМ позволяет работать в широком диапазоне увеличений приблизительно от $\times 10$ (что эквивалентно увеличению сильной ручной линзы) до $\times 1\,000\,000$, что приблизительно в 500 раз превышает предел увеличения лучших оптических микроскопов.

Поверхность сканирования обязательно напыляется металлом: платина, золото, палладий и др.

Электронная микроскопия (примеры)

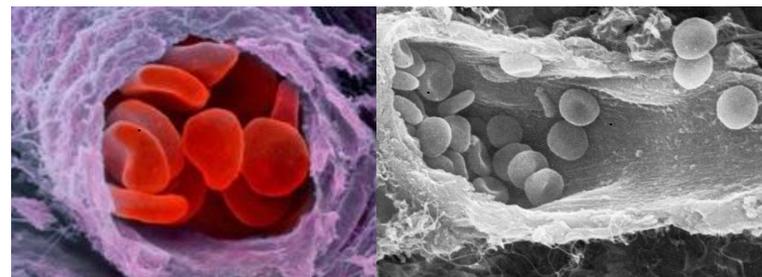
трансмиссионная



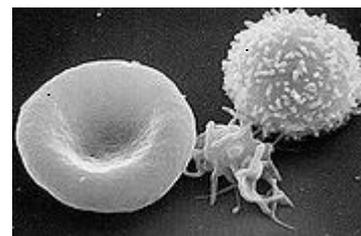
Тучная клетка



сканирующая



Эритроциты в артериоле



Эритроцит,
тромбоцит,
лейкоцит

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. Чельшева. – 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.