

Вводное занятие

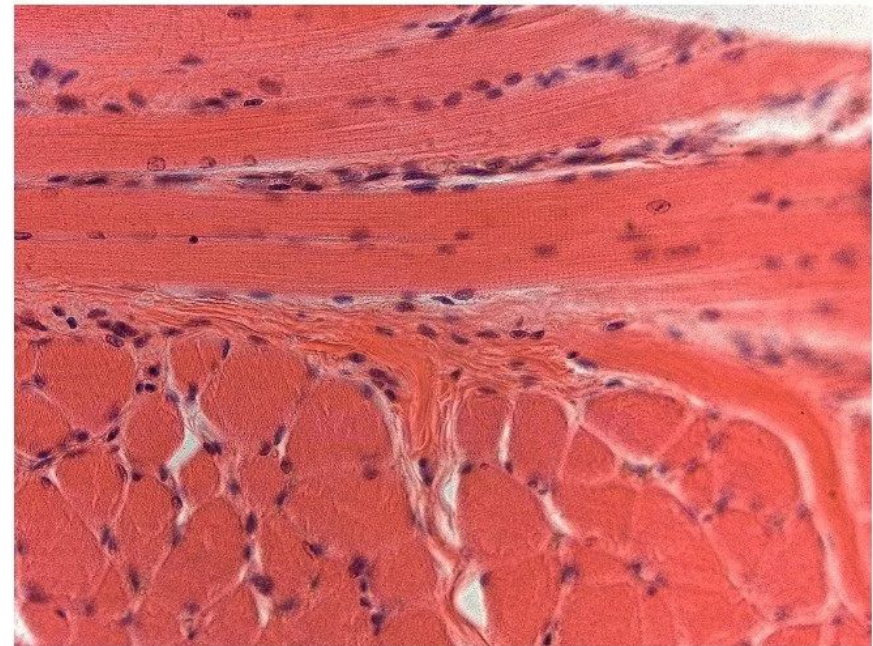
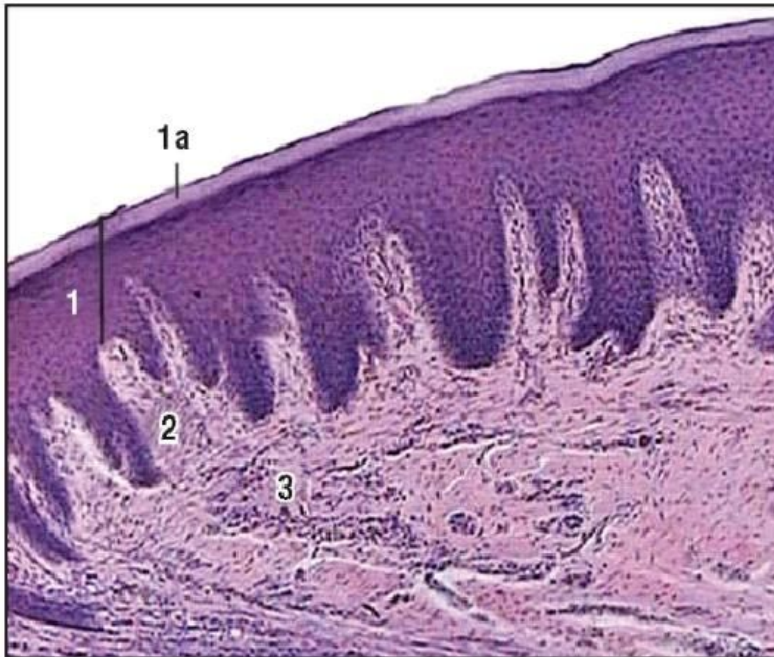
Методы в гистологии

Что изучает наука гистология

- Гистология наука о тканях организма (эпителиальная, соединительная (включая хрящевую, костную, кровь), мышечная,

Многослойный плоский ороговевающий эпителий десны (окраска гематоксилином и эозином, большое увеличение):

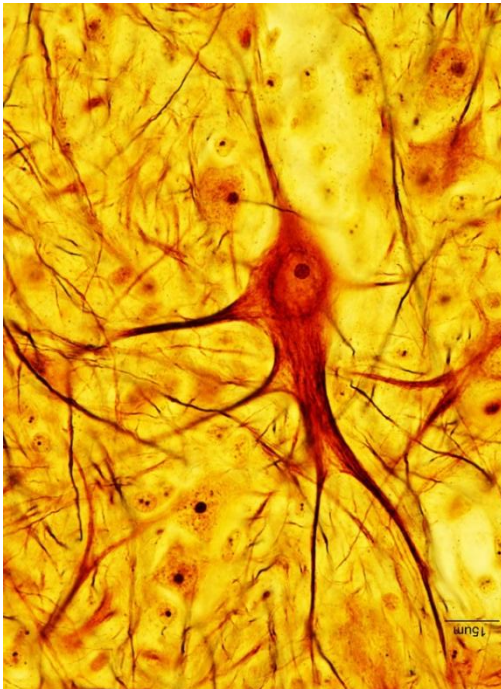
1 - многослойный плоский ороговевающий эпителий (1a - роговой слой); 2 - соединительнотканые сосочки; 3 - сетчатый слой (плотная соединительная ткань)



Гистологические элементы

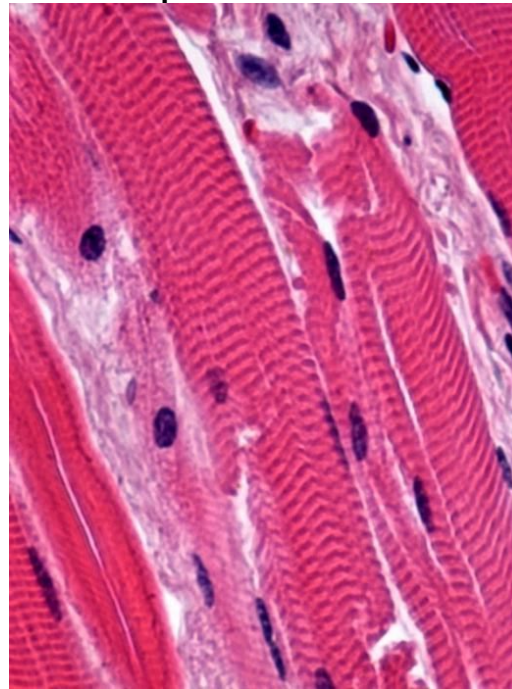
- Ткани состоят из гистологических элементов: клеток, симпластов, синцитиев, межклеточного вещества.

Клетка

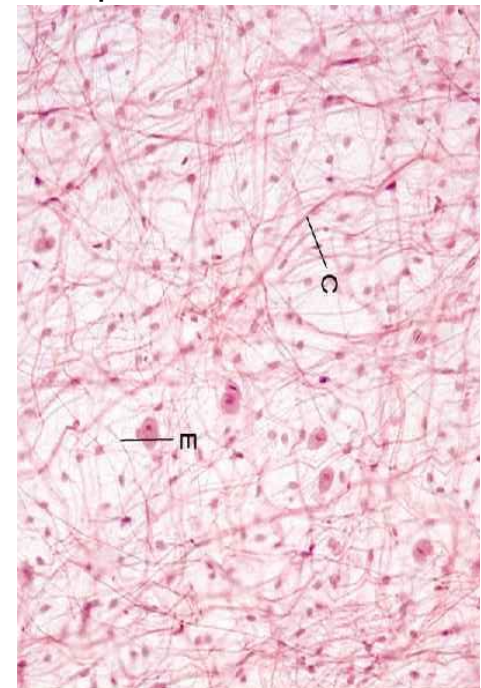


Симплас

T



Межклеточное
вещество



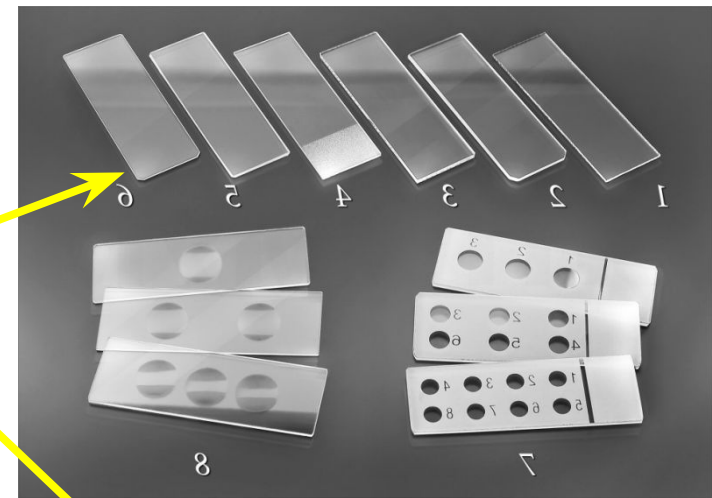
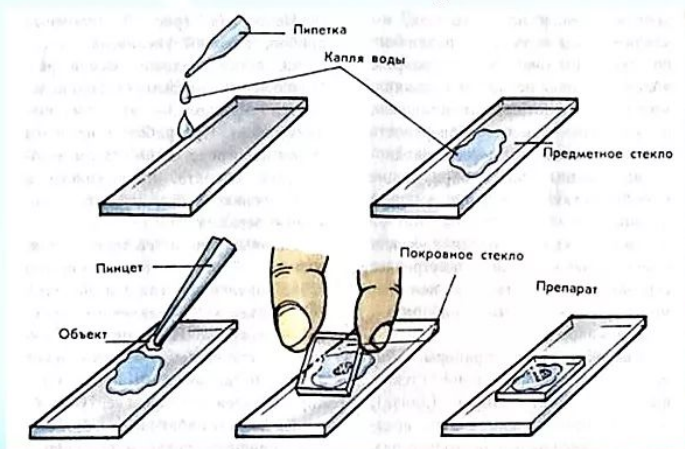
Как получить такую картинку?

Методы приготовления рутинных гистологических препаратов.



МИКРОПРЕПАРАТ

- предметное стекло
- покровное стекло



Приготовленные по специальной методике препараты (срезы толщиной 7мкм) исследуют с помощью светового микроскопа и получают микрофотографии.



Для того, чтобы ткань можно было нарезать так тонко ее нужно уплотнить, сделать твердой и остановить в ней все процессы «как при жизни».

Протокол проводки и заливки в парафин •

- **1. Фиксация** в забуференном формалине (ок. 24 ч.) •
- 2. Промывка в проточной водопроводной воде (20 мин.) •
- **3. Дегидратация.**
- 50% этанол (20 мин.)
- • 70% этанол (20 мин.) •
- 96% этанол (две смены по 20 мин.)
- • 96% этанол (оставляем на ночь) •
- **4. Пропитка заливочной средой:**
- Абсолютный этанол:ксилол (1:1; 20 мин.)
- • Ксилол (три смены по 20 мин.)- 3 смена при $t = 56^{\circ}\text{C}$
- • Смесь ксилол:парафин 1:1(20-25 мин. при температуре 56°C)
- • Парафин 1 при температуре 56°C (1 ч.)
- • Парафин 2 при температуре 56°C (1 ч.) • Парафин 3 охладить

Этапы приготовления микрорепаратов.

- 1. **Фиксация ткани** - после забора ткани (постмортально, интраоперационно и/или биопсийно) кусочек ткани помещают в раствор фиксатора для предотвращения посмертных изменений в тканях и органах.

*Для рутинной гистологии используют 4% раствор **формальдегида** (10% **формалин**).*



Что происходит во время фиксации

- Фиксация предотвращает посмертные изменения в тканях и клетках: обеспечивает стабилизацию внутриклеточных структур, останавливает аутолиз, стабилизирует локализацию структур. Таким образом цель фиксации – **сохранить строение тканей и клеток максимально как при жизни**. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов.

Дегидратация

- . Ткани проводят через спирты с постепенным повышением концентрации от 30% до 96% два раза по 20 минут в каждой концентрации. При этом вода в цитоплазме клеток и межклеточном веществе постепенно замещается на спирт. Далее спирт необходимо заместить растворителем для заливочной среды

Пропитка заливочной средой

- После дегидратации в ткани вся вода заместилась на спирт.
- Далее необходимо заместить спирт на растворитель для парафина, а затем на расплавленный парафин. Для этого используют ксилол или хлороформ. Сначала выдерживают ткань в чистом ксилоле, затем в смеси ксилола и парафина две смены в концентрации 1:1 по 12 часов в каждой.
- Затем ткань можно пропитывать чистым парафином две смены: 12 часов и 1,5 часа в термостате при 60 градусах .

Заливка в парафин



- Далее ткань помещается в смесь парафина с воском в концентрации 9:1 и выдерживается в ней 1,5 часа при 60 градусах в специальных заливочных формочках, затем формочки переносят из термостата в комнатную температуру. Парафин застывает при комнатной температуре. Далее из полученных твердых блоков можно изготовить срезы.

Современная автоматизированная зпливочная станция



Приготовление срезов

- Срезы толщиной в среднем 7 мкм изготавливают с помощью специального прибора микротом



Срезы монтируют на обезжиренные предметные стекла

- Предварительно обработанные адгезивными растворами (для того, чтобы срезы приклеились к стеклу и не отваливались в дальнейшем процессе. Это может быть яичный белок с желатином или фирмен



Депарафинизация

- Приклеенные к стеклу парафиновые срезы будут белые и не проницаемые для водных красителей.
- Следовательно их необходимо перевести обратно из парафина в водную фазу.

Протокол депарафинизации

Все
наоборот

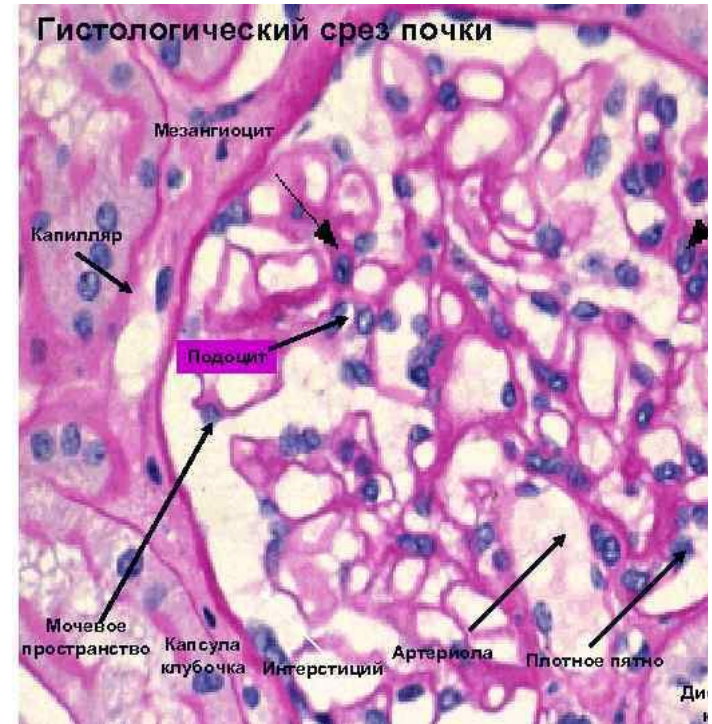
Ксилол I	10-15 мин (можно в термостате при 37 °С)
Ксилол II	3 - 5 мин
Спирт 100 % I	1-2 мин
Спирт 100 % II	ополоснуть
Спирт 96 % I	ополоснуть
Спирт 96% II	ополоснуть
Дистиллированная вода	2 смены

Окрашивание гистологических срезов

- 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.

В гистологической практике применяют основные, кислотные и нейтральные красители.

- **Основные, или ядерные, красители** - это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются базофильными (гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый и др.).
- **Кислотные красители** - это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются эозин, кислый фуксин, конго красный (конгорот), эритрозин.
- **Нейтральные красители**: судан III, судан IV, метиленовый синий.
- Процесс гистологического окрашивания условно подразделяют на прогрессивный и регрессивный, прямой и непрямой, простой и сложный. При прогрессивном типе окрашивания процесс идет до тех пор, пока не достигается интенсивное проникновение красителя в ткань. Регрессивный тип основан на первоначальном переокрашивании структур с последующей дифференцировкой до нужного уровня. Если раствор красителя непосредственно действует на ткань, то говорят о прямом окрашивании. Окрашивание после предварительной подготовки ткани (протравливания) называется непрямым. Окрашивание одним красителем - простое, а при использовании нескольких красителей - сложное.



Окрашивание гематоксилин- ЭОЗИНОМ

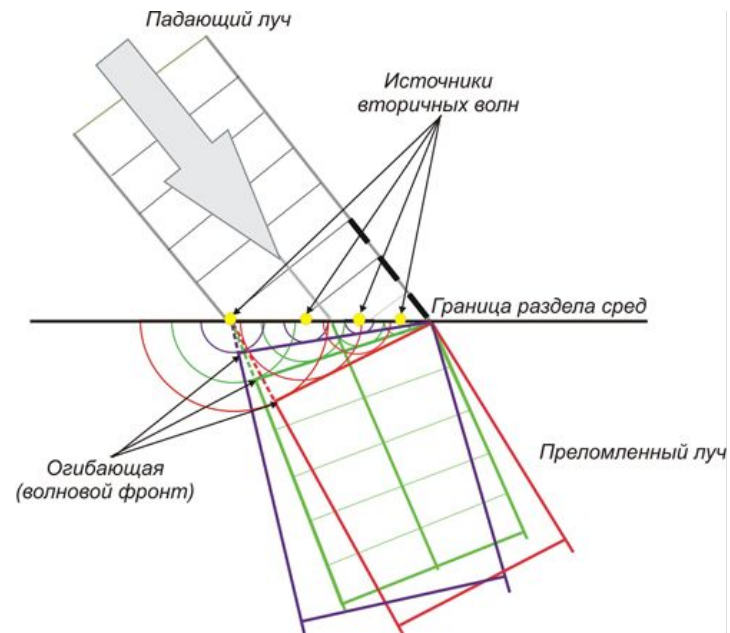
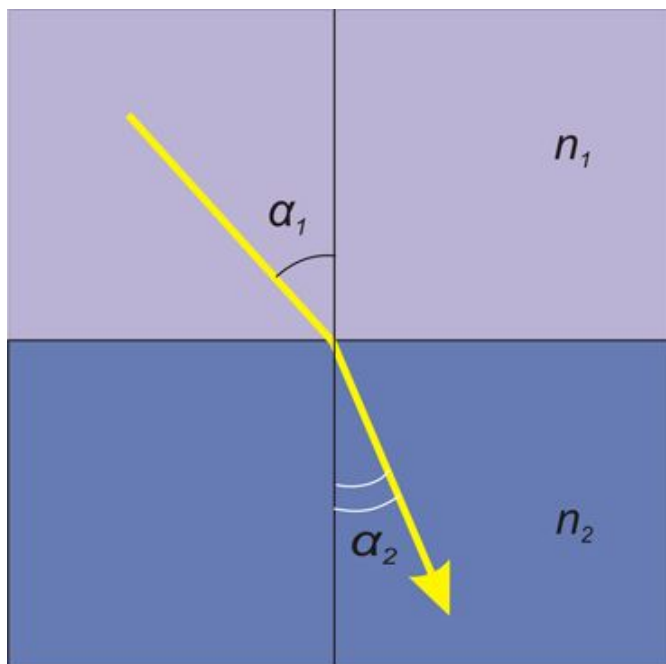
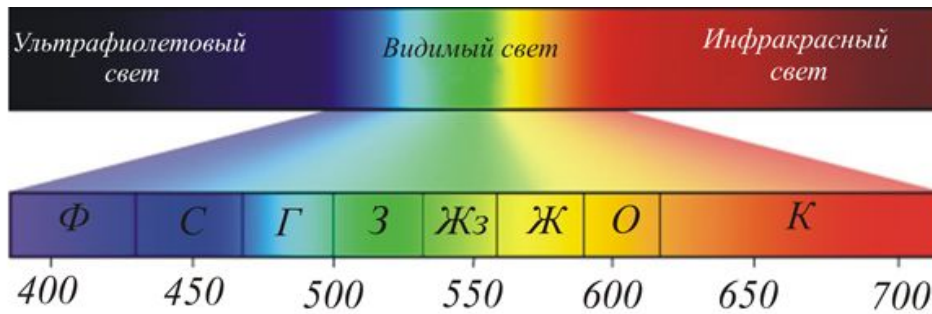
- Дистиллированная вода ополоснуть
- Раствор гематоксилина 1-20 мин
- Солянокислый спирт дифференцировка
- Аммиачная вода срезы синеют (контроль под микроскопом)
- Проточная вода 5-10 мин
- Дистиллированная вода ополоснуть
- Раствор эозина 10с-3 мин
- Спирт 96%, карбол-ксилол,
- Заключение под покровное стекло
-



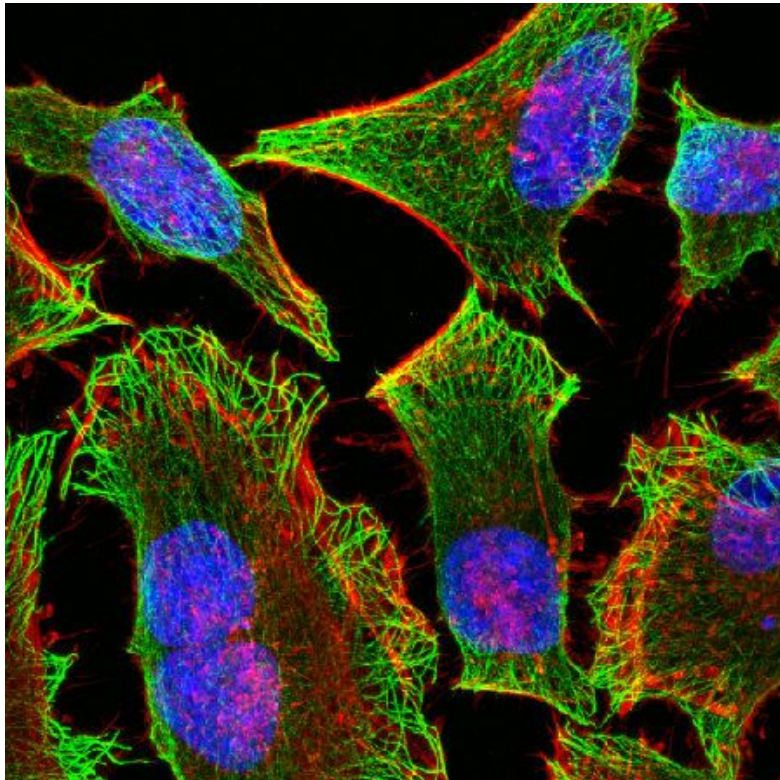
Строение светового микроскопа



Свет

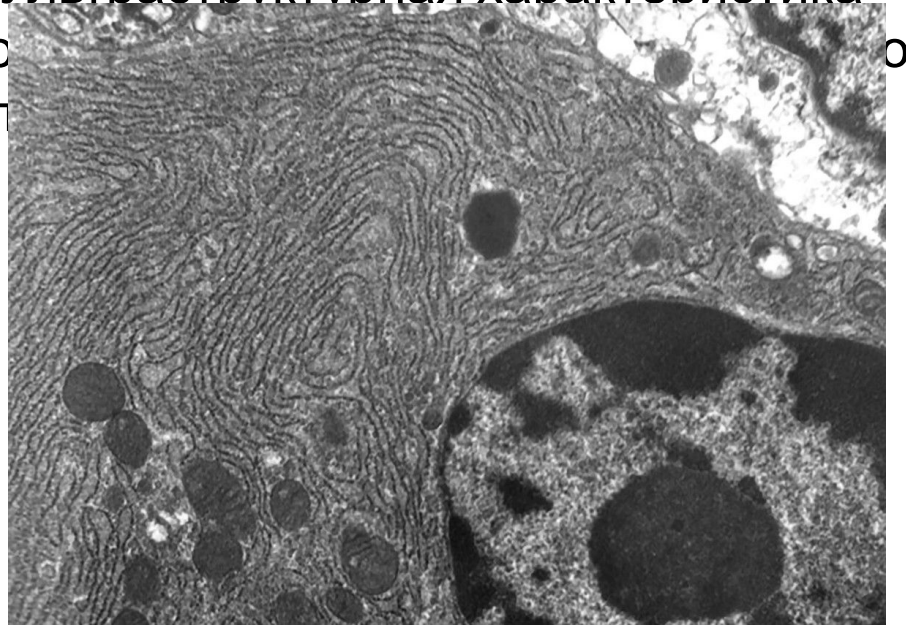
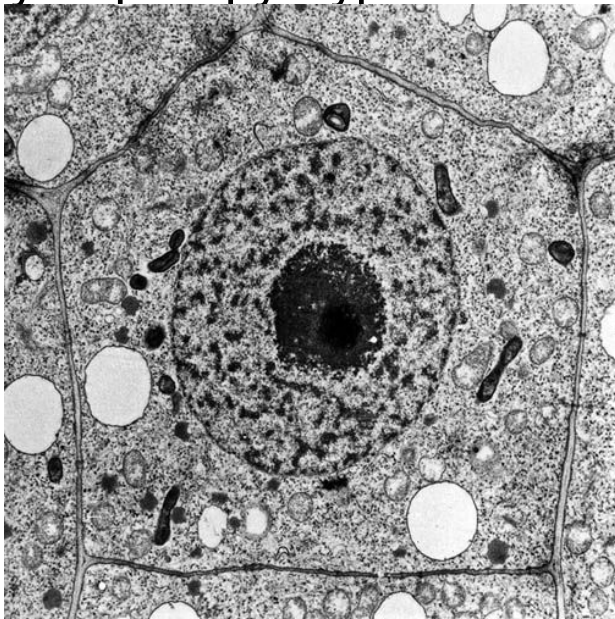


Флюоресцентный микроскоп Конфокальный микроскоп

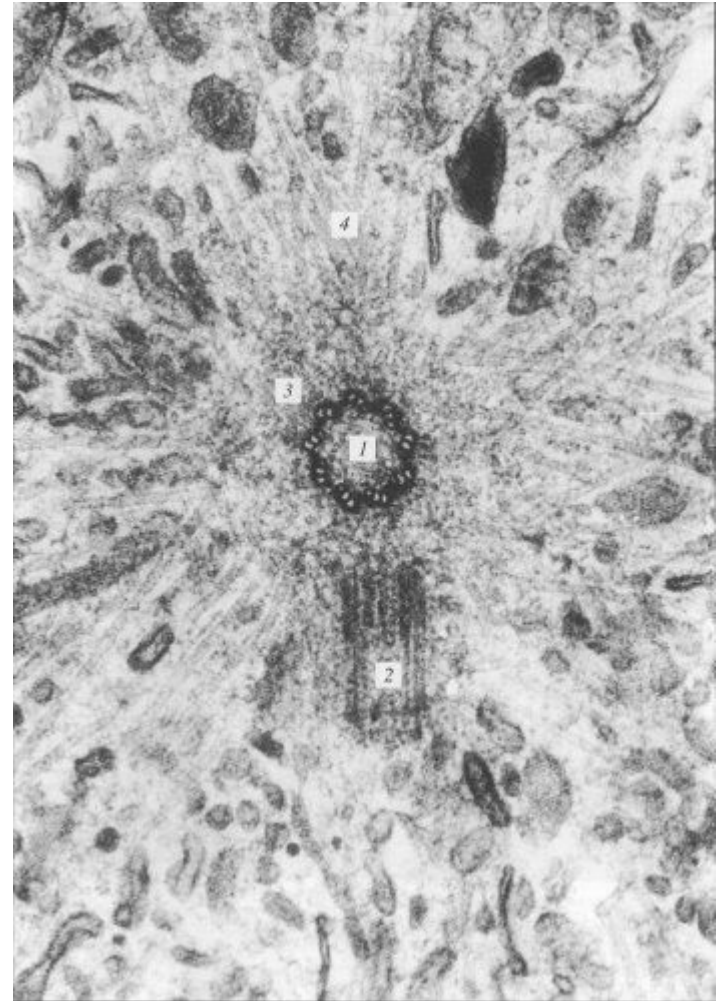
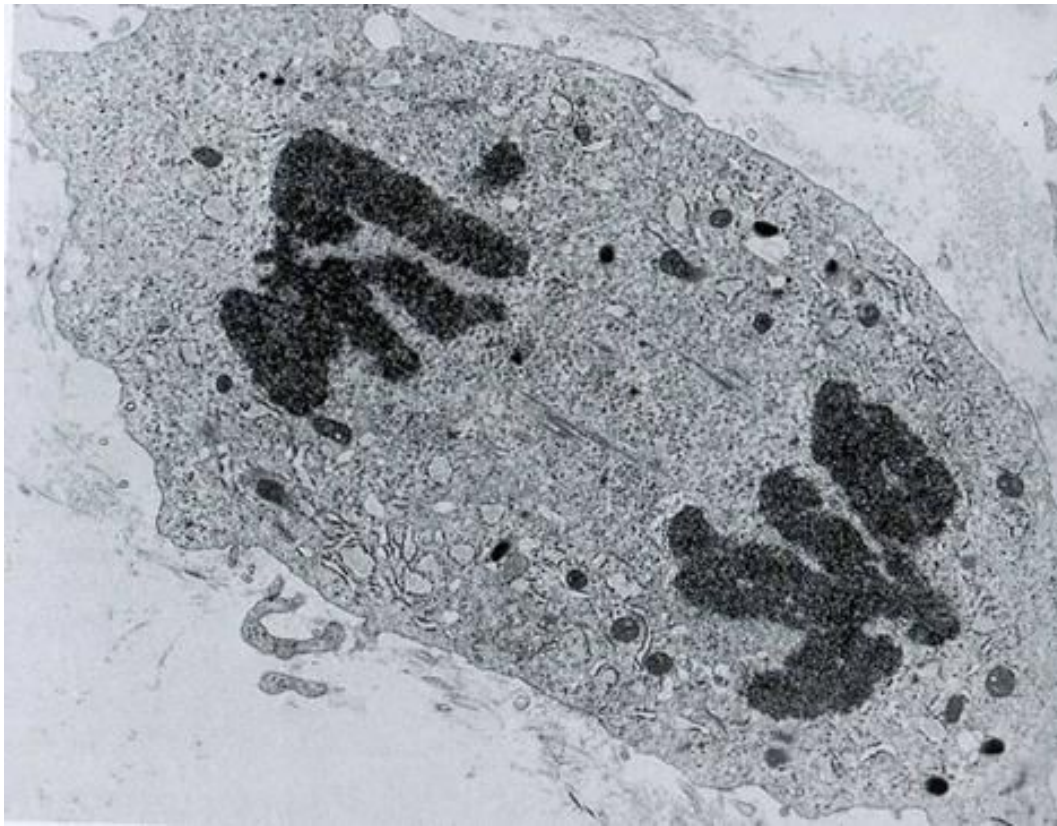


Электронная микроскопия

- Метод дает увеличение в 5 – 100 тысяч раз! Вместо светового луча пучек электронов.
- **Метод трансмиссионной электронной микроскопии** позволяет заглянуть внутрь клетки, увидеть внутриклеточные структуры, органоиды и даже цитоскелет, проследить тонкие детали межклеточных взаимодействий, показать внутри и экстраклеточную локализацию отдельных белков, рецепторов или других функциональных молекул, все это называется ультраструктурой клетки. Ультраструктурная характеристика

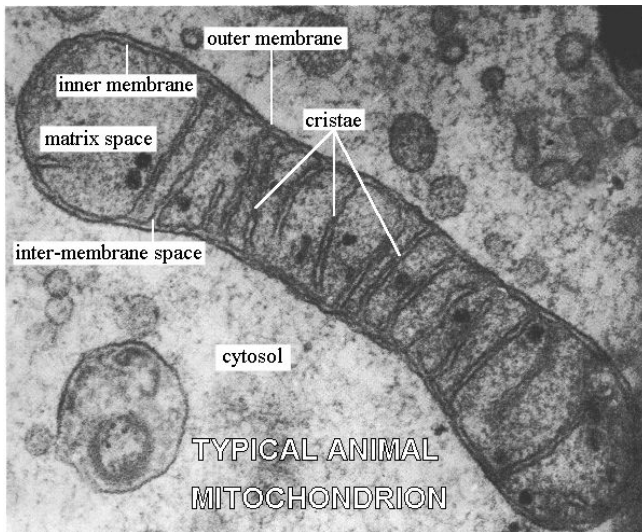


Деление

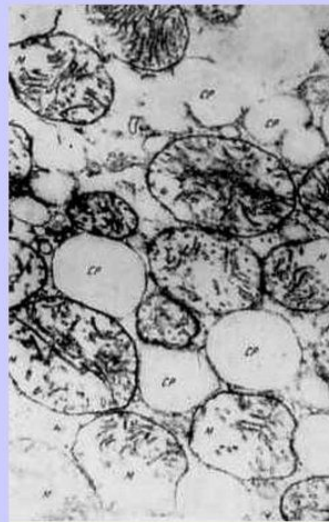


Морфо функциональный анализ

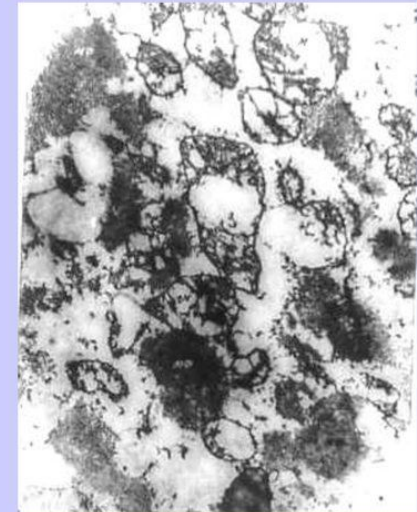
- Например: Ультратонкая организация митохондрий может рассказать о том, нормально ли протекает процесс дыхания, окисления, энергетического обеспечения клетки, а может быть и стадии гибели путем апоптоза.



Изменения митохондрий при ГИПОКСИИ



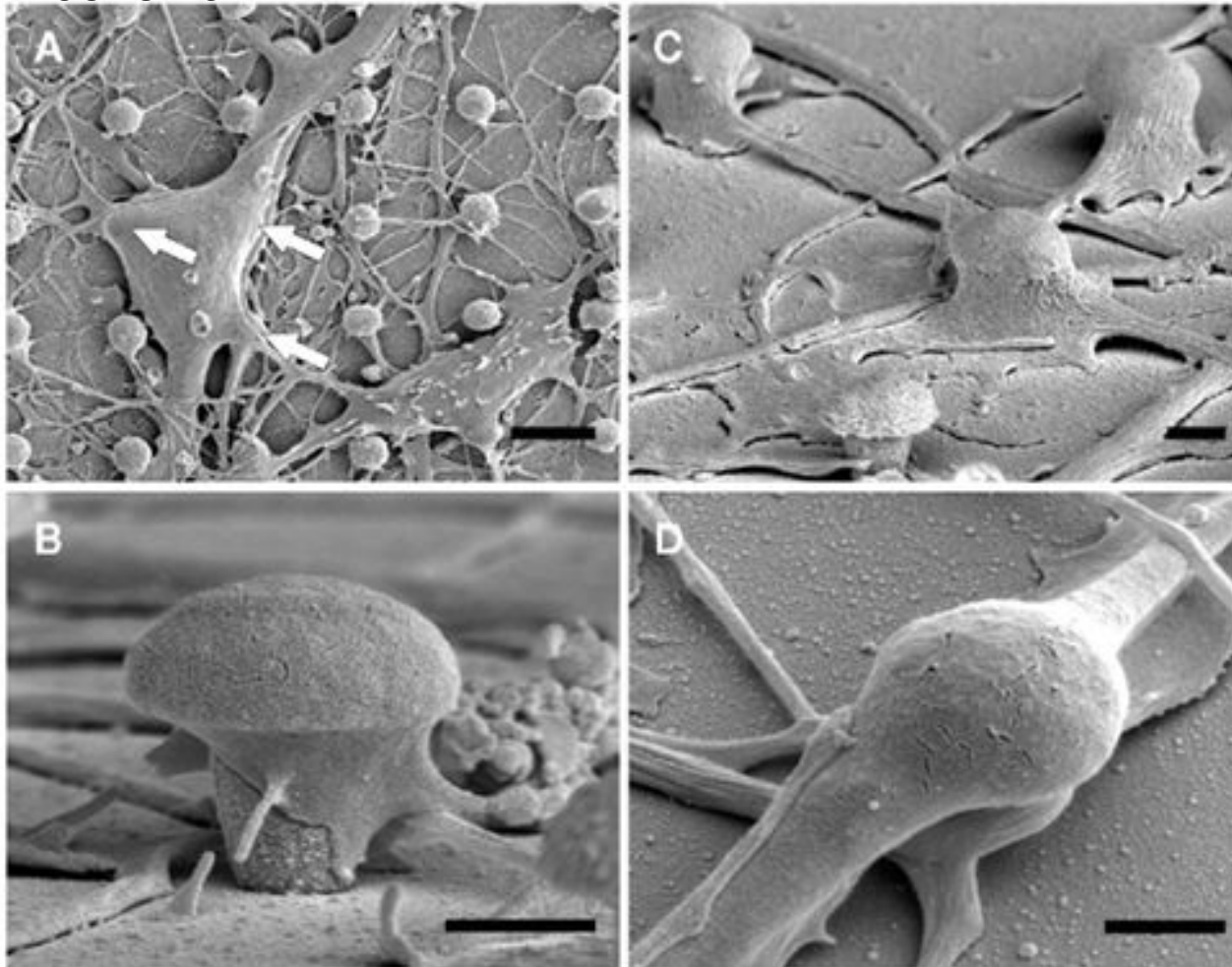
Набухание митохондрий
Разрушение крист



Освобождение митохондриального кальция

Сканирующая электронная микроскопия

Позволяет получить изображение поверхности
объекта



Пробоподготовка для электронной микроскопии

