

Схема - строение светового микроскопа

Осветительная система:

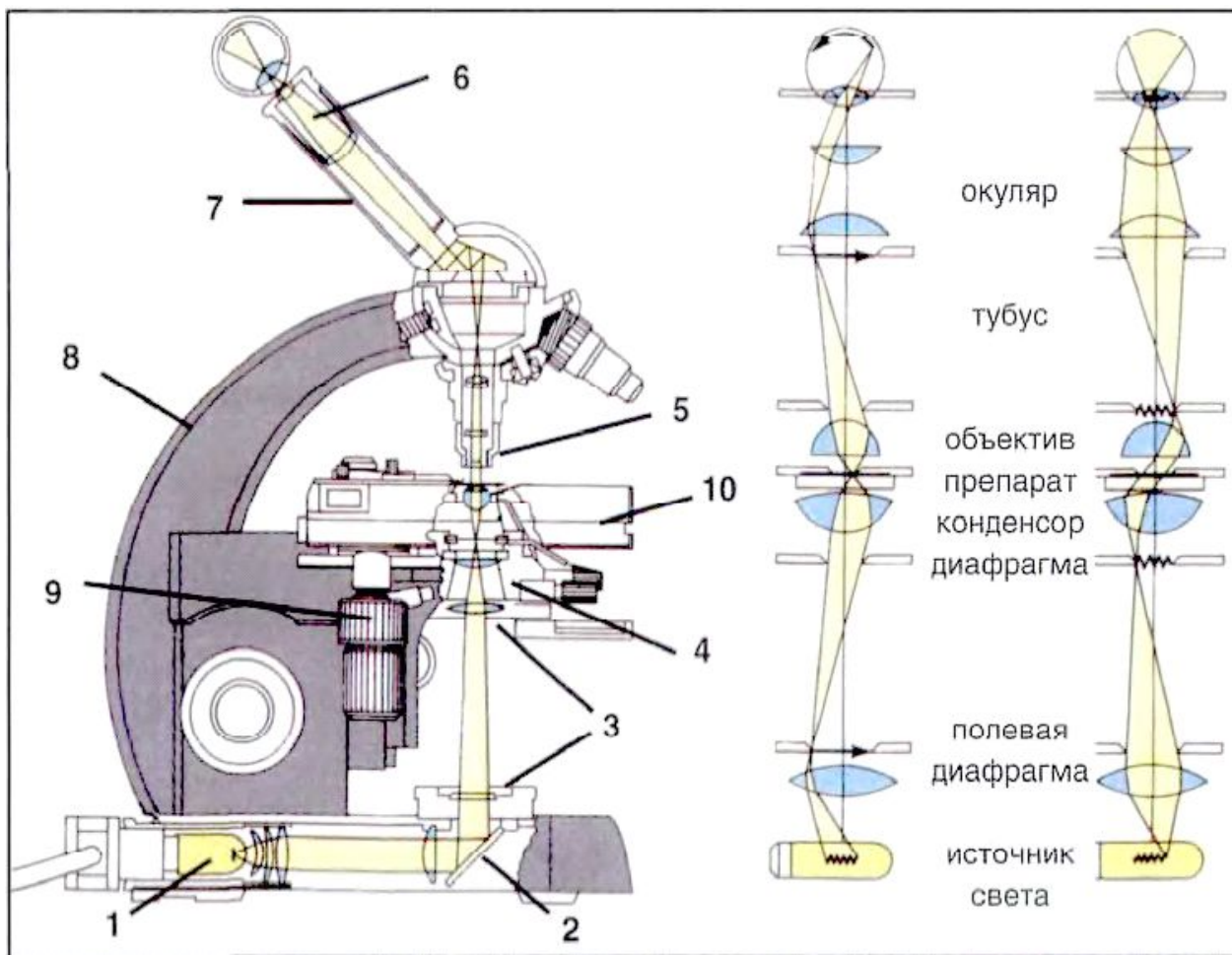
- 1 — источник света;
- 2 — зеркало;
- 3 — диафрагма;
- 4 — конденсор.

Оптическая система:

- 5 — объектив;
- 6 — окуляр.

Механическая система:

- 7 — тубус;
- 8 — штатив;
- 9 — колонка;
- 10 — предметный столик.



Общий вид электронного микроскопа



ВИДЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ препаратов:

- 1. По характеру взятого материала различают следующие виды гистологических препаратов:
- а) **срезы** органов (толщиной 5-15 мкм),
б) **мазки** (крови, костного мозга и т.д.) и **отпечатки** (напр., селезёнки),
в) **плёнки** (брюшины, мягкой мозговой оболочки), или **тотальные препараты**
- Чаще всего используются срезы.
- 2. Приготовление препарата обычно включает 5 следующих этапов:
- а) **взятие и фиксация материала,**
б) **обезвоживание и уплотнение материала,**
в) **приготовление срезов,**
г) **окрашивание препаратов и**
д) **заключение в консервирующую среду.**

Фиксация гистологического материала

- осуществляется для “закрепления” его прижизненного строения. Она предотвращает разложение извлеченных из организма тканей под действием собственных ферментов и способствует сохранению целостности клеточных и тканевых структур. Воздействуя на ткани, фиксатор (например, формалин, спирт, пикриновая кислота или различные сложные смеси веществ), вызывает необратимую коагуляцию белков и быструю гибель клеток.

Обезвоживание

- осуществляется путем последовательного помещения кусочка такни в спирты возрастающих концентраций для удаления из него воды. Оно необходимо для выполнения следующего этапа обработки материала - его заливки

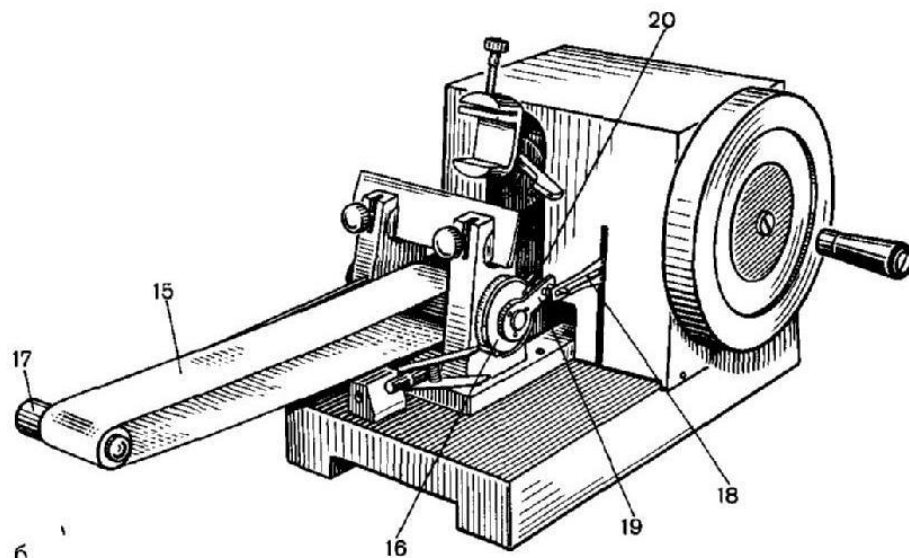
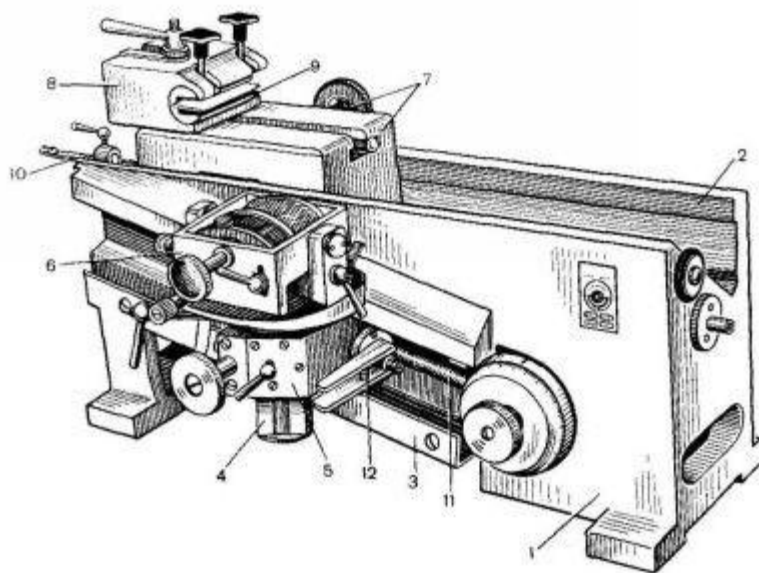
Заливка (уплотнение) материала

- достигается путем пропитывания обезвоженного кусочка затвердевающими средами: расплавленным парафином, целлоидином или специальной пластической массой. В результате заливки после охлаждения парафина или полимеризации пластмассы кусочек ткани (блок) становится достаточно плотным для получения тонких срезов при резке.

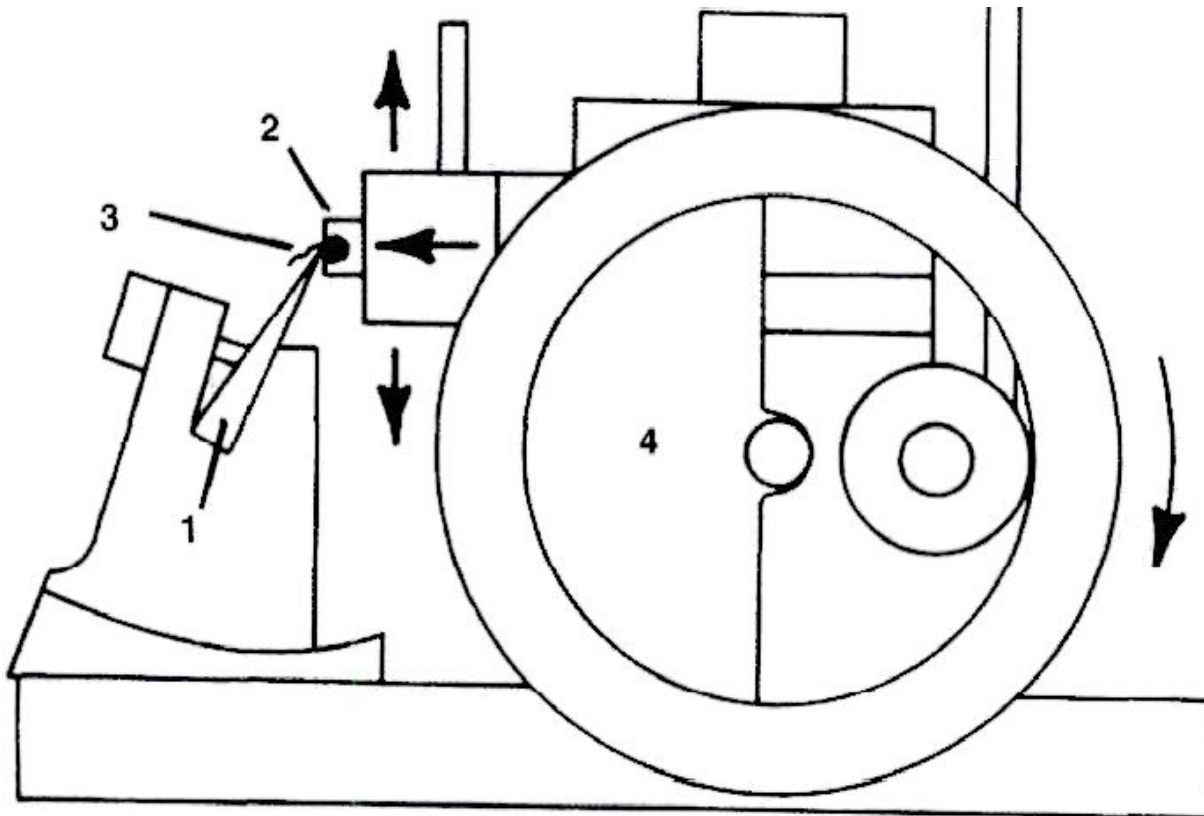
Приготовление гистологических срезов (резка)

- осуществляется на специальном приборе (микротоме) с помощью особых стальных ножей - бритв. При этом обычно получают срезы залитого в парафин или другую среду материала толщиной 5-7 мкм (в оптимальном варианте - серийные, т.е. следующие один за другим в виде непрерывной ленты).

Санний микротом (МС-2) и ротационный микротом для парафиновых срезов (МПС-2)



микротом - прибор для приготовления срезов.

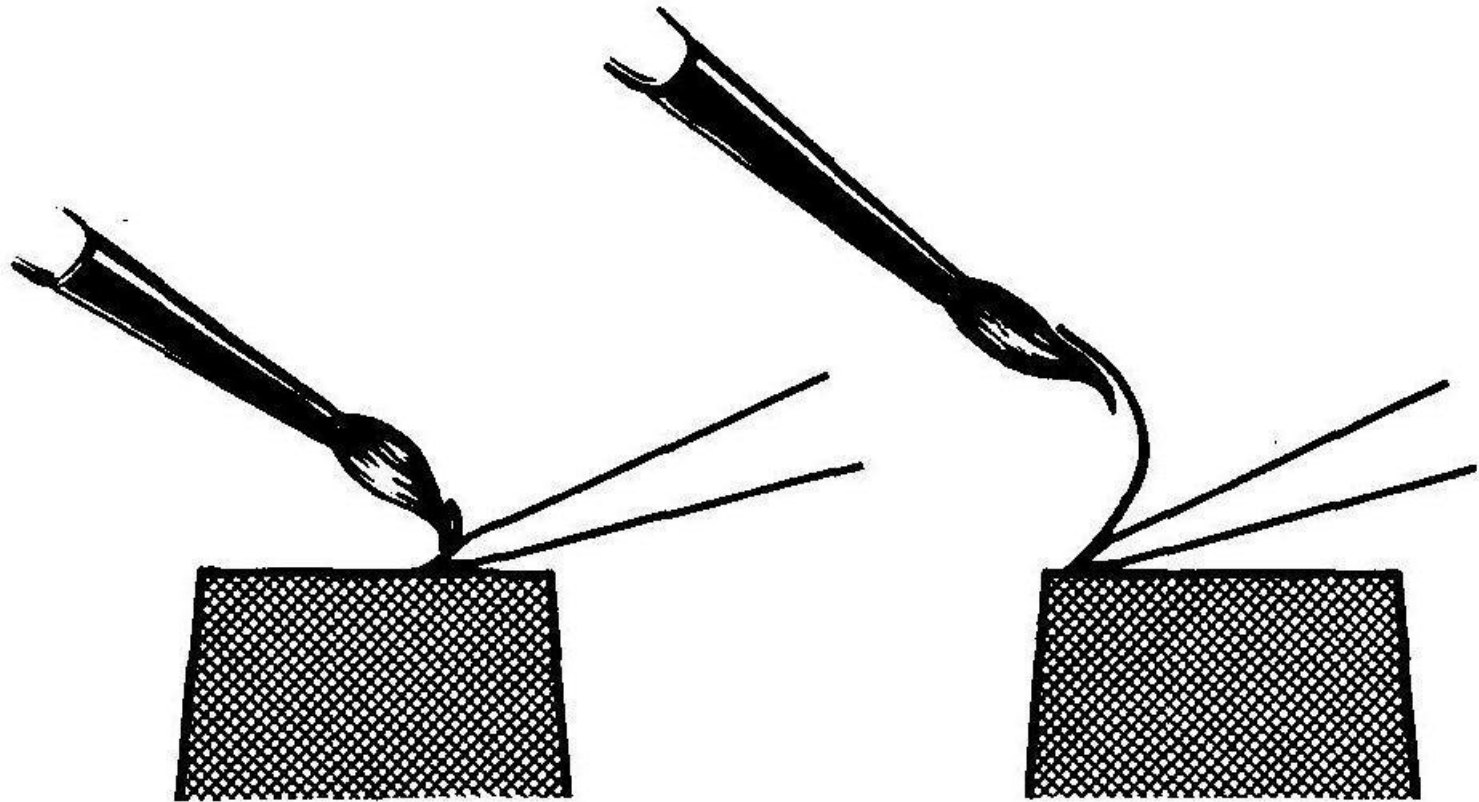


1 – нож;

2 – парафиновый
блок с заключенным
в него образцом;

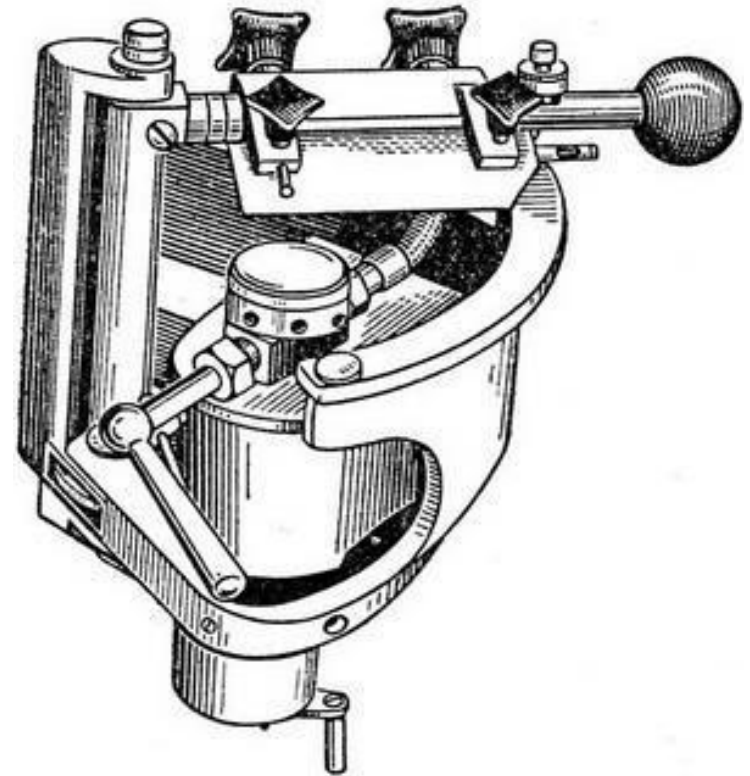
3 – срез;

4 – подающее
устройство



- При резке больших блоков и твердого материала срезы часто закручиваются. Однако этого можно избежать путем придерживания и приподнимания среза кисточкой за передний его край в процессе резки.

- Для получения срезов нефиксированной ткани, а также в случаях, когда необходимо изучить объект в короткий промежуток времени, используют **замораживающие микротомы**, снабженные замораживающим столиком, на котором укрепляется исследуемый объект. Столик гибким шлангом соединен с металлическим баллоном, в котором находится жидкая углекислота. Для замораживания тканевых блоков применяют также термоэлектрический охлаждающий столик (ТОС-1)



Депарафинирование срезов перед окрашиванием

Ксилол 1	10-15 мин., можно в термостате при 37 С
Ксилол 2	3-5 мин
Спирт 100%-1	1-2 мин
Спирт 100%-2	ополоснуть
Спирт 96%-1	ополоснуть
Спирт 96%-2	ополоснуть
Дистиллированная вода	2 смены

Окрашивание срезов

- обычно производится после их приклеивания на предметное стекло и удаления из них парафина (депарафинирования). Окрашивание позволяет выявить различные структурные компоненты тканей и клеток благодаря их неодинаковому сродству к гистологическим красителям.

Типы красителей

Все красители, используемые в гистологической технике, подразделяются на 4 типа:

Тип красителя	Пример	Окрашиваемые структуры
Индифферентные красители	Судан III, ● судан IV	Суданом окрашиваются жировые капли (в которых он растворяется).
Кислые красители	Кислоты и кислые соли : ● эозин (искусственная краска; название - от греч. эос - заря); ● кислый фуксин.	а) Окрашиваемые структуры называются оксифильными (имеющими сродство к кислым красителям). б) Это белковые компоненты цитоплазмы и неклеточные структуры

<p>Основные красители</p>	<p>Основные соли : гемаксилин (точнее, продукт его окисления - гематеин); азур 2, кармин.</p>	<p>а) Красящиеся структуры – базофильные (сродство к основным красителям). б) Это структуры, богатые нуклеиновыми или иными кислотами – ядра, рибосомы, аморфный компонент межклеточного вещества</p>
<p>Нейтральные красители</p>	<p>Смесь двух красителей: основного (азур 2) и кислого (эозин).</p>	<p>а) Структуры, воспринимающие кислые красители, окрасятся эозином; пример - специфические гранулы в эозинофильных лейкоцитах. б) Ядра всех клеток окрашиваются азуром 2.</p>

Общие методы окраски

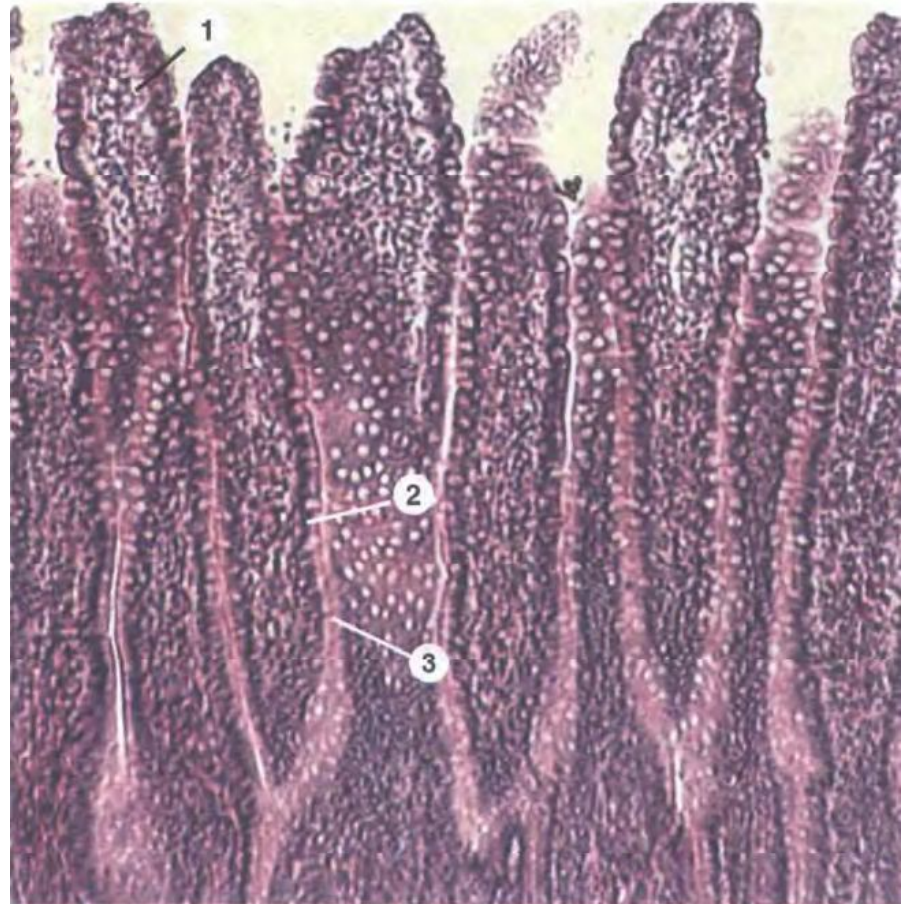
Окраска гематоксилин-эозином

- 1.а) Самый распространённый метод окраски.
- б) Сочетает основной и кислый красители.
- в) Поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие неклеточные структуры.
- 2. При этом
 - ядра прокрашиваются гематоксилином, т.е. приобретают **сине-фиолетовый** цвет,
 - а цитоплазма красится эозином в **желтовато-розовый** цвет.
- 3. Замечание: используемый гематоксилин готовится по методу Эрлиха: окисляется до гематеина калийными квасцами.

Препарат - срез тонкой кишки.

Окраска гематоксилин-эозином

- а) На снимке видны кишечные ворсинки (1): они находятся на внутренней поверхности тонкой кишки.
- б) Ворсинки покрыты одним слоем эпителиальных клеток.
- в) Ядра (2) этих клеток – фиолетового,
- а цитоплазма (3) – розового цвета.

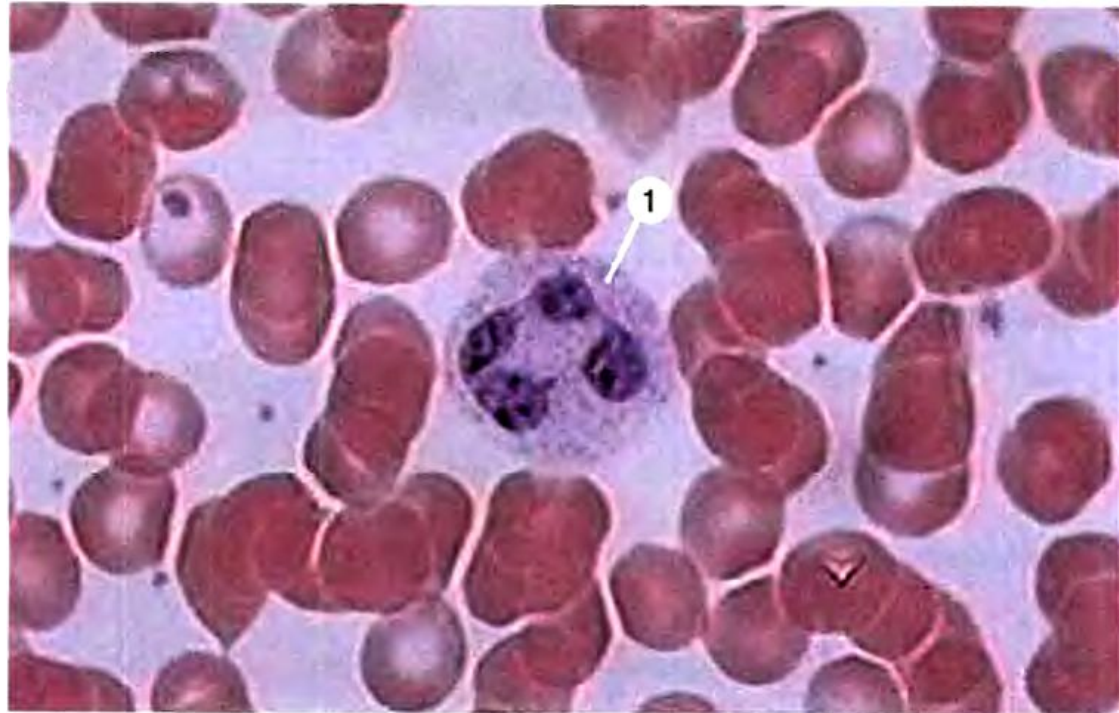


Окраска мазков по Романовскому

- 1. Применяется для окраски мазков крови и красного костного мозга. Здесь тоже используются 2 красителя:
- основной – аzur II, окрашивающий базофильные структуры в **тёмно-синий** цвет,
- и кислый – эозин, красящий оксифильные структуры в **ярко-розовый** цвет.
- 2. Отличия от приготовления срезов таковы:
- фиксацию мазков проводят чистым метанолом;
- окрашивание продолжают всего 30-45 мин, а не несколько часов;
- для заключения под покровное стекло используют кедровое масло, а не канадский бальзам.
- 3. В результате
- эритроциты приобретают **розовый** цвет,
- цитоплазма большинства лейкоцитов – **голубой** или **синий** цвет,
- цитоплазматические гранулы окрашиваются в зависимости от их природы.

Препарат – мазок крови

- Среди многочисленных эритроцитов видны:
- лейкоцит (1) с очень мелкой нейтрофильной (фиолетово-розовой) зернистостью в цитоплазме,
- а также гораздо более мелкие тромбоциты.



Окраска железным гематоксилином (по методу Генденгайна)

- 1. Препарат
- предварительно обрабатывают (протравляют) железноаммиачными квасцами,
- а потом обрабатывают гематоксилином.
- 2. Структуры приобретают коричневато-серый цвет.
- 3. Хорошо выявляются
- структуры ядра,
- границы клеток,
- мышечные волокна.
- Препарат - срез языка.
- В мышечных волокнах видны ядра (1) и отчётливая поперечная исчерченность.



Выявление неклеточных структур соединительной ткани

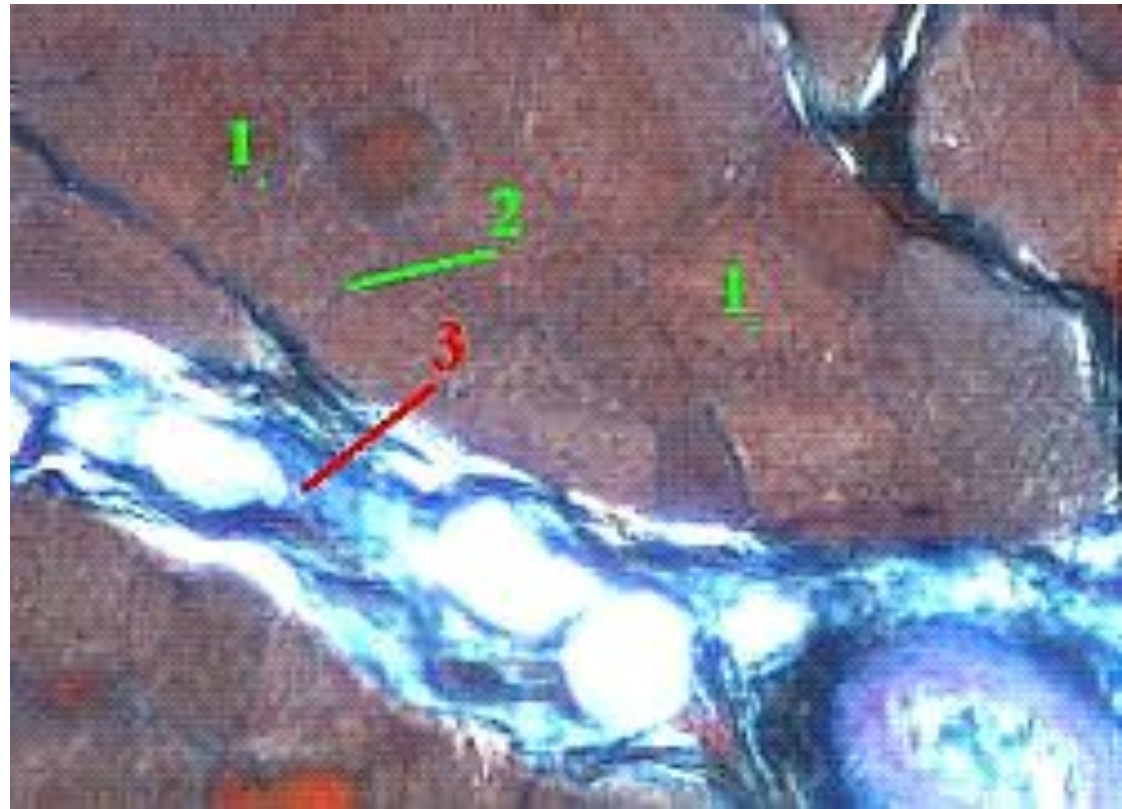
Выявление коллагеновых волокон.

Окраска по методу Маллори

- 1. Краситель – смесь кислого фуксина, анилинового синего и оранжевого G.
- 2. Коллагеновые волокна окрашиваются в синий цвет.

Препарат - срез мышцы.

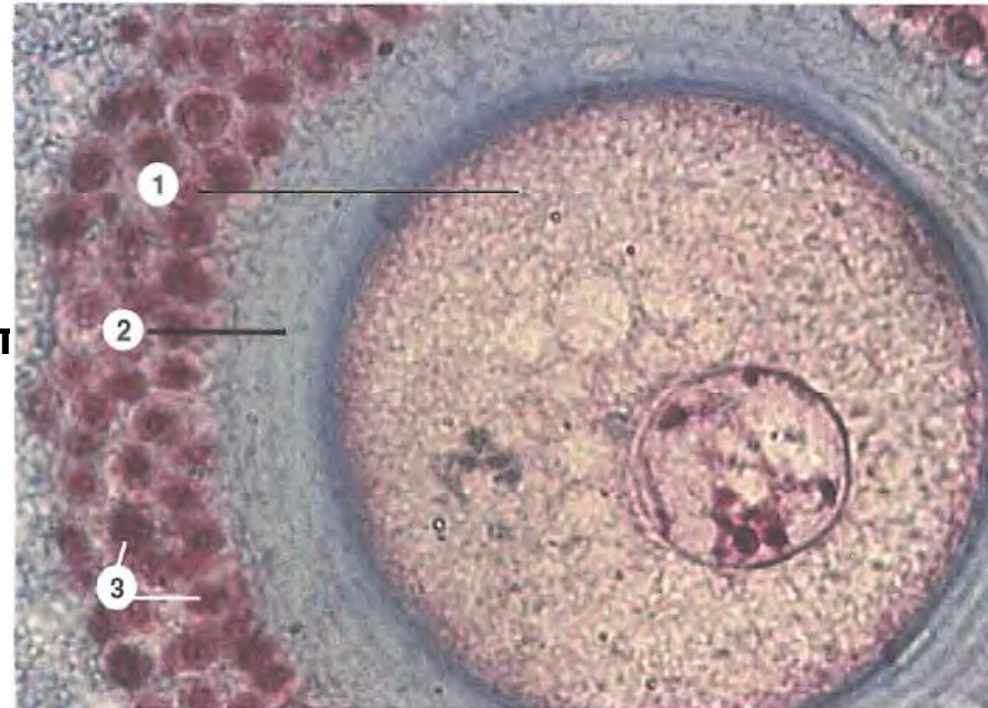
- Мышечные волокна (1) – розовые,
- а прослойки соединительной ткани (2 и 3) между ними – синие.



Препарат - срез яичника кролика.

Окраска по Маллори.

- 1. На снимке - женская половая клетка (ооцит), находящаяся в фолликуле яичника.
- Цитоплазма (1) клетки окрашена в слабо-розовый,
- окружающая её блестящая оболочка (2) - в сине-голубой,
- а ядра фолликулярных клеток (3) - в фиолетовый цвет
- 2. Синий цвет блестящей оболочки свидетельствует о том, что в ней, помимо прочих компонентов, содержатся коллагеновые волокна.
- Окраска по Маллори используется не только для выявления компонентов соединительной ткани, но и в иных целях, например, для дифференциации эндокринных клеток гипофиза.



Окраска по методу Ван Гизона

- Красители – пикриновая кислота и кислый фуксин:
- **коллагеновые волокна** окрашиваются в ярко-красный цвет,
- а элементы других тканей (напр., **мышечные волокна**) – в жёлтый цвет.

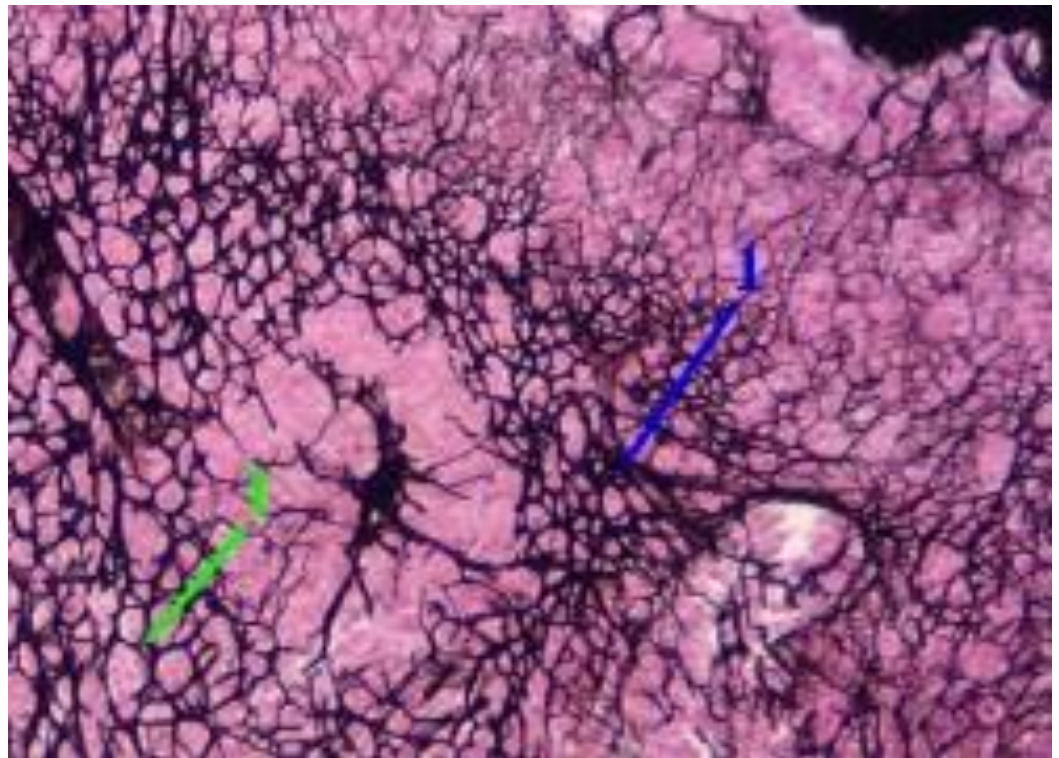
Выявление ретикулярных волокон.

Импрегнация серебром

- 1. Препарат обрабатывают аммиачным раствором серебра, а затем – восстановителями.
- 2. Выделяющееся серебро осаждается на ретикулярных (аргирофильных) волокнах (богатых SH-группами), и волокна приобретают чёрный цвет.

Препарат - срез лимфоузла.

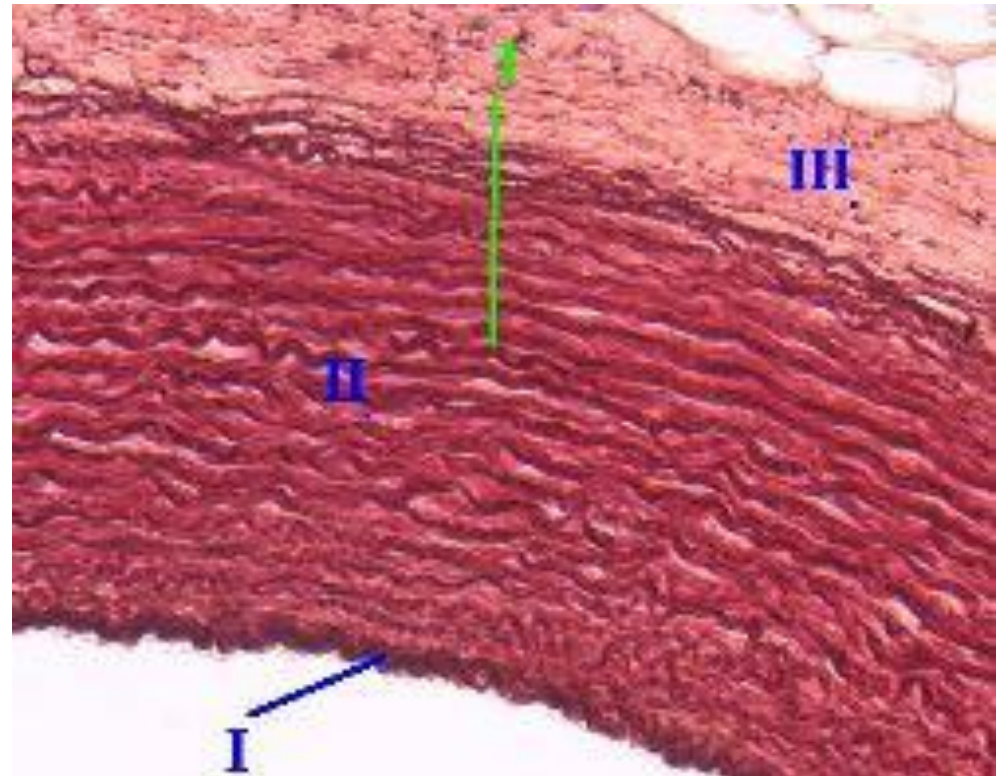
Видны многочисленные ретикулярные волокна (1), образующие густую сеть.



Выявление эластических элементов Окраска орсеином

- эластические волокна и мембраны (если таковые имеются) приобретают вишнёвый цвет;
- остальные структуры – слабо-розовый.

- Препарат - срез аорты.
- В её средней оболочке (II) обнаруживаются многочисленные эластические мембраны (1) – в виде толстых извилистых линий, расположенных концентрически.

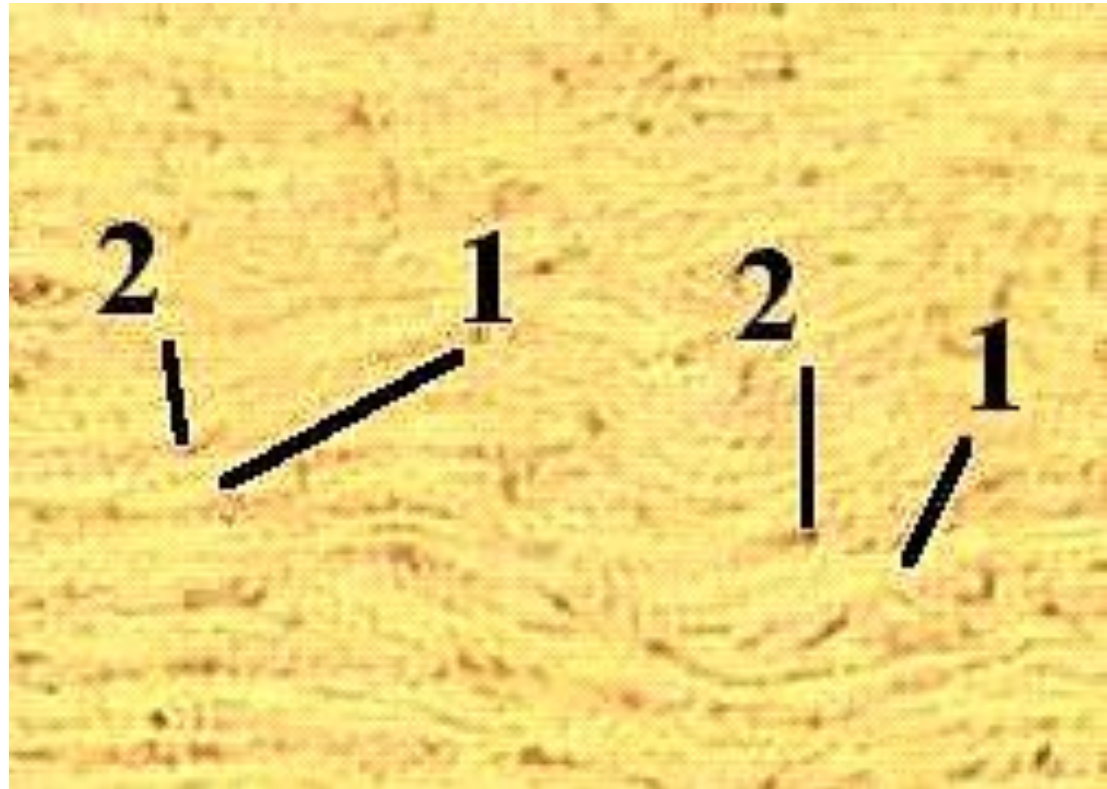


Окраска пикрофуксином и гематоксилином

- **эластические волокна** окрашиваются в жёлтый цвет,
- **коллагеновые волокна** – в красный цвет,
- **ядра** клеток – в фиолетовый цвет.

Препарат – срез
эластической связки.

Видны пучки
эластических волокон (1)
и между ними – клетки
(фиibroциты) (2).



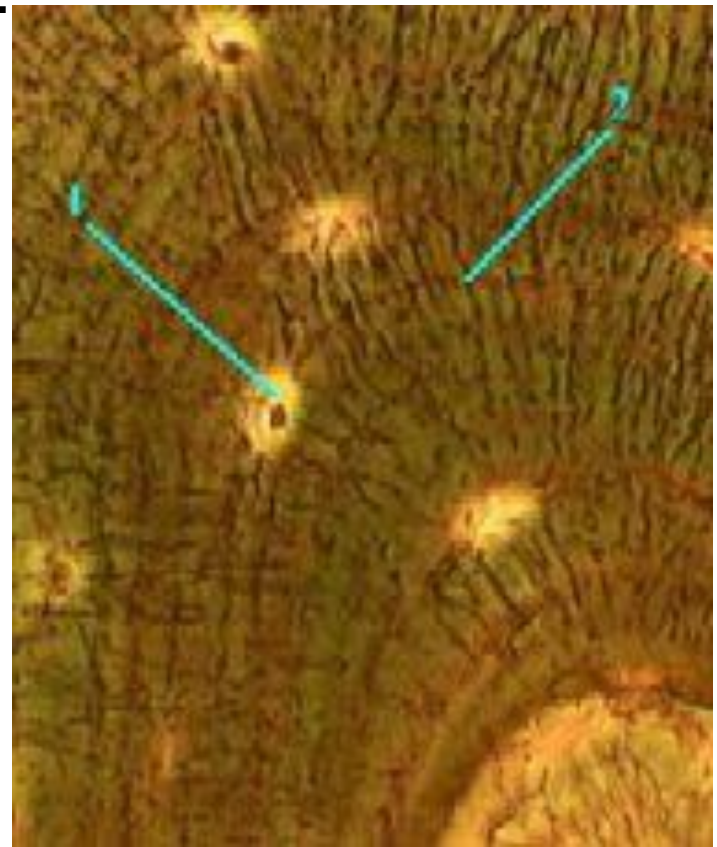
Выявление элементов костной ткани

Окраска по методу Шморля

- 1. Вначале кусочек кости для размягчения подвергают декальцинации (с помощью кислоты).
- 2. Краситель – раствор тионина.
- 3. **Стенки костных полостей и канальцев** (выстланные сетью коллагеновых волокон) окрашиваются в тёмно-коричневый цвет; остальной фон – светло-коричневый.

Препарат - срез трубчатой кости.

В костном веществе видны костные полости (1), содержащие тела костных клеток (остеоцитов), и костные канальцы (2), содержащие отростки остеоцитов.



Выявление элементов нервной системы

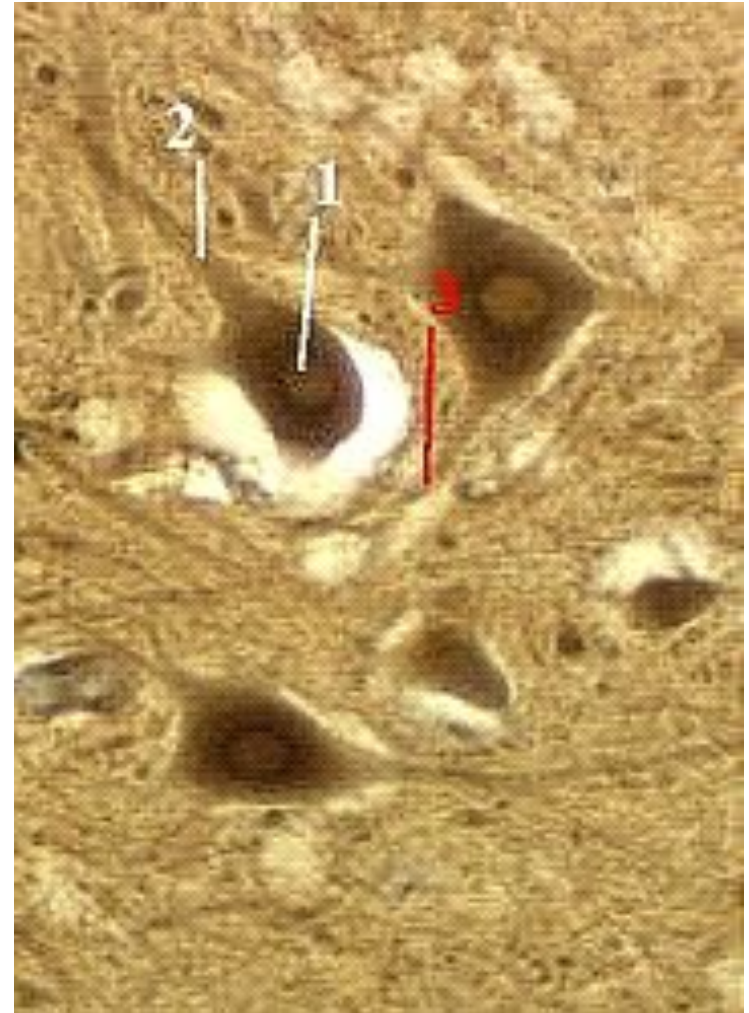
Выявление клеток нервной системы и их отростков

Импрегнация нитратом серебра

- 1. В этом методе**
 - фиксацию материала в формалине проводят не менее 7 дней,**
 - а уплотнение образца осуществляют путём замораживания.**
- 2. При окрашивании срез обрабатывают растворами**
 - азотнокислого серебра,**
 - формалина,**
 - аммиачного серебра.**
- 3. Клетки и волокна нервной системы окрашиваются в чёрный цвет, а окружающие ткани – в светло-коричневый цвет.**

Препарат - срез спинного мозга. Импрегнация нитратом серебра

- Видны нервные клетки, имеющие
 - тёмную цитоплазму,
 - более светлое ядро (1) и
 - отростки (2 и 3).



Выявление базофильных структур в цитоплазме нейронов Окраска по методу Ниссля

1. Красителем служит толуидиновый синий, окрашивающий умеренно **базофильные соединения** в синий цвет.
2. Таким образом в цитоплазме нервных клеток обнаруживаются глыбки базофильного вещества (т.н. **субстанция Ниссля**).

Препарат - срез спинного
мозга.

Вышеуказанные глыбки
содержатся в теле (1) нейрона
и в некоторых отростках (2).



Выявление миелиновых нервных волокон

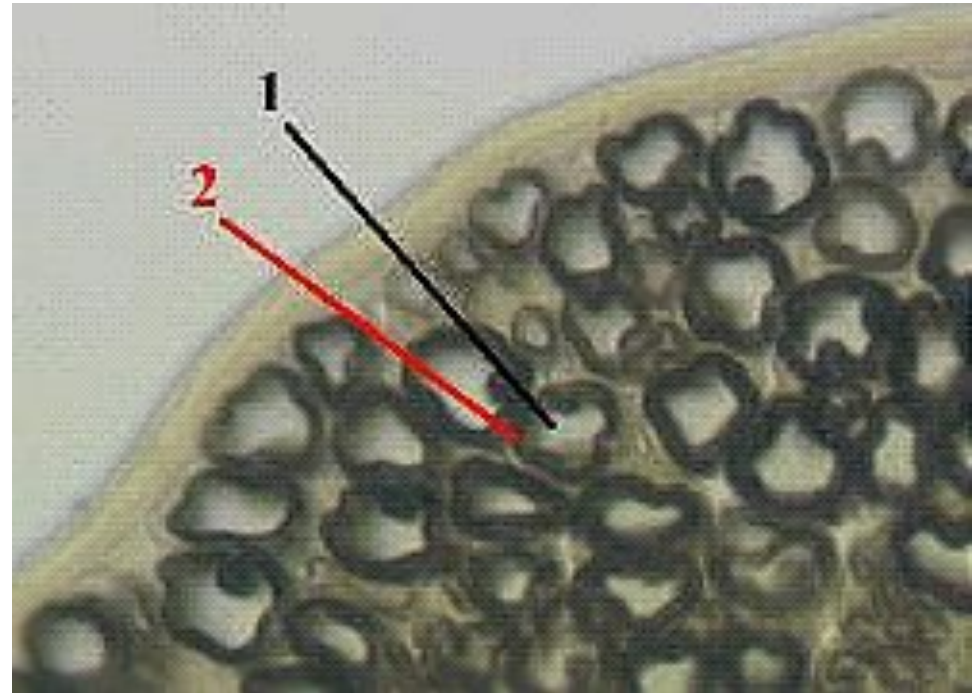
Фиксация или импрегнация осмием

- 1. Метод применим для выявления всех структур, богатых липидами или жирами, – мембран, жировых или липидных капель и т.д.
- 2. Растворяя в себе осмиевую кислоту, эти структуры приобретают чёрный цвет.

Препарат - поперечный срез нерва

Фиксация или импрегнация осмием

- Видны поперечные срезы миелиновых нервных волокон.
- У каждого из них светлый осевой цилиндр (1) окружён толстой миелиновой оболочкой (2).
- Последняя имеет мембранную природу и потому – осмиофильна.



Гистохимические методы исследования

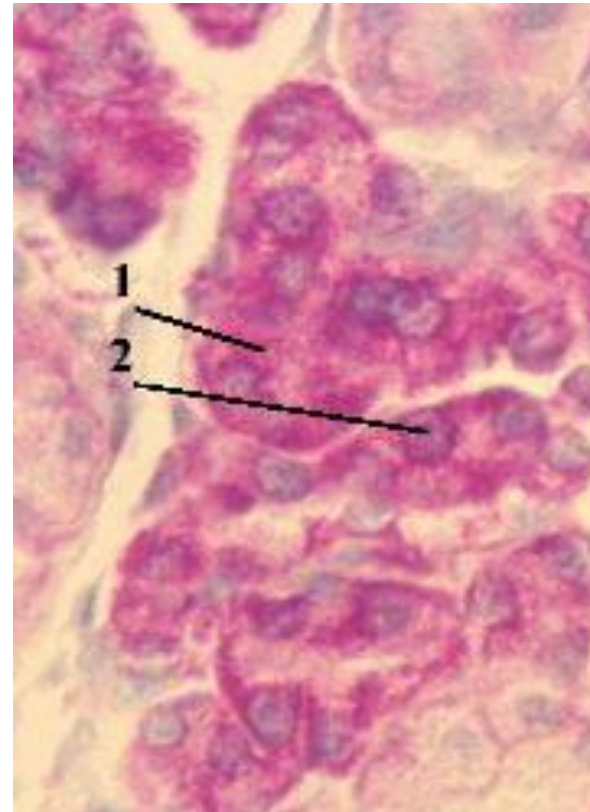
- ✓ Гистохимические методы основаны на **специфической** реакции между химическим реактивом и определённым компонентом препарата.
- ✓ Образующийся продукт реакции имеет окраску, **отличную** от окраски исходного реактива

Реакция Браше – на РНК

- 1. Реактив – смесь двух красителей: метилового зелёного и пиронина.
- 2. Пиронин окрашивает **структуры, богатые РНК**, в малиновый цвет. **Другие структуры** – зелёные.
- 3. Чтобы проверить специфичность окраски, делают контрольный препарат, который перед окрашиванием обрабатывают рибонуклеазой.

Препарат - срез поджелудочной железы.

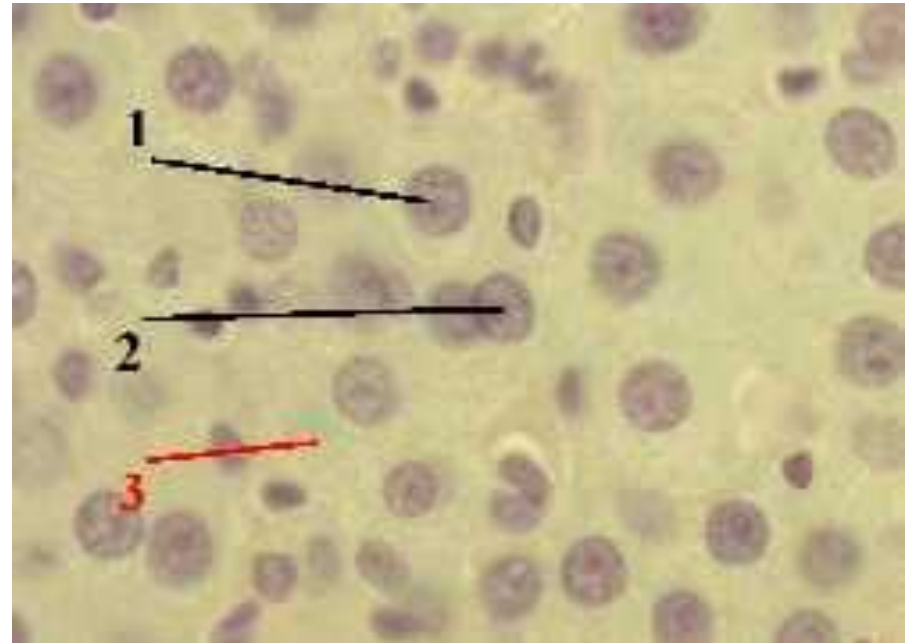
В малиновый цвет окрашены **цитоплазма (1)** и **ядрышки (2)** секреторных клеток – из-за высокого содержания в них **РНК** (в составе рибосом и их предшественников).



Реакция Фёльгина – на ДНК

1. Основной реактив – фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа).
2. а) Под его действием **ДНК-содержащие структуры** окрашиваются в вишнёвый цвет.
б) **Прочие структуры** – зелёные.

Препарат - срез печени.
Распределение окраски –
противоположное
предыдущему:
в вишнёвый цвет красится
хроматин (1) в ядрах,
а **ядрышки** (2) и **цитоплазма** (3)
клеток оказываются зелёными.



Реакции на белки

Используются различные реакции; в том числе:

- ✓ с бромфеноловым синим (у **белков** - тёмно-фиолетовая окраска);
- ✓ со смесью нингидрин-реактив Шиффа (**белки** приобретают красный цвет).

ШИК-реакция – на полисахариды

- 1. Реактив - Шифф-периодная кислота (выделенные буквы и составляют аббревиатуру ШИК).
- 2. Периодат способствует образованию в субстрате альдегидной группы, которая взаимодействует с реактивом Шиффа.
- 3. На препарате ШИК-положительные компоненты (например, гранулы гликогена) имеют **фиолетовый** или **тёмно-красный** цвет.

Препарат - срез тонкой кишки. ШИК-реакция.

- На снимке – кишечная ворсинка.
- В составе покрывающего её эпителия выделяются своей **фиолетовой** цитоплазмой т.н. бокаловидные клетки (1).
- Эти клетки активно секретируют слизь, отчего в их цитоплазме накапливаются полисахариды – компоненты слизи.

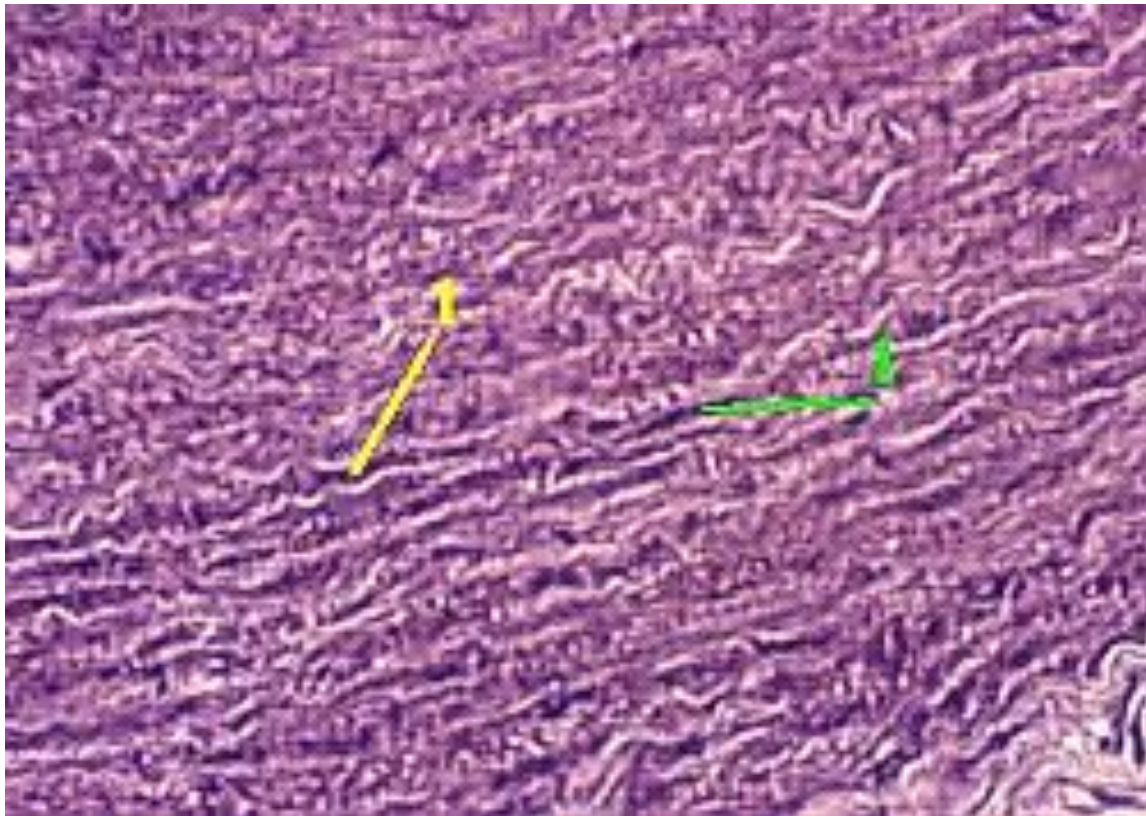


Реакция с толуидиновым синим – на гликозамингликаны

- 1. При взаимодействии толуидинового синего с веществами, содержащими много кислотных групп, наблюдается метахромазия – изменение окраски с **синей** на **фиолетовую** и **красную**.
- 2. Подобным свойством обладают, в частности, компоненты межклеточного аморфного вещества соединительной ткани – гликозамингликаны (являющиеся гетерополисахаридами с высоким содержанием кислотных радикалов).

Препарат - срез аорты.

Снимок показывает, что стенка аорты богата гликозаминогликанами.



Реакция с **суданом III** – на нейтральный жир

- 1. Как уже отмечалось, **судан III** – представитель индифферентных, или липофильных, красителей.
- 2. Проникая в клетки, он растворяется в жировых и **липидных каплях** и тем самым окрашивает их в ярко-оранжевый цвет.

Тотальный препарат сальника.

Окраска суданом III и гематоксилином.

- Препарат является тотальным, т.е. перед нами - не срез органа, а участок сальника, растянутый на предметном стекле.
- Видны **жировые клетки**; каждая из них содержит крупную каплю жира (1), которая занимает почти всю цитоплазму и окрашена в ярко-оранжевый цвет.
- Клеточные ядра (2) должны краситься гематоксилином в фиолетовый цвет. В данном случае они окрашены весьма слабо.
- Ядро оттесняется жировой каплей к периферии клетки.

