



Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
"Ивановская государственная медицинская академия"
Минздравсоцразвития России

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии

1

**Материалы и методы
цитогистологического исследования.
Значение для медицинской
диагностики
Часть 1**

доцент., к.м.н. Гринева Мария Рафаиловна

[назад](#)

[далее](#)

ГИСТОЛОГИЯ и другие науки

АНАТОМИЯ

ФИЗИОЛОГИЯ

БИОХИМИЯ

**Патологическая
анатомия**

ГИСТОЛОГИЯ

**Патологическая
физиология**

**Лабораторная
диагностика**

Фармакология

**Клинические
дисциплины**

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

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Введение

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

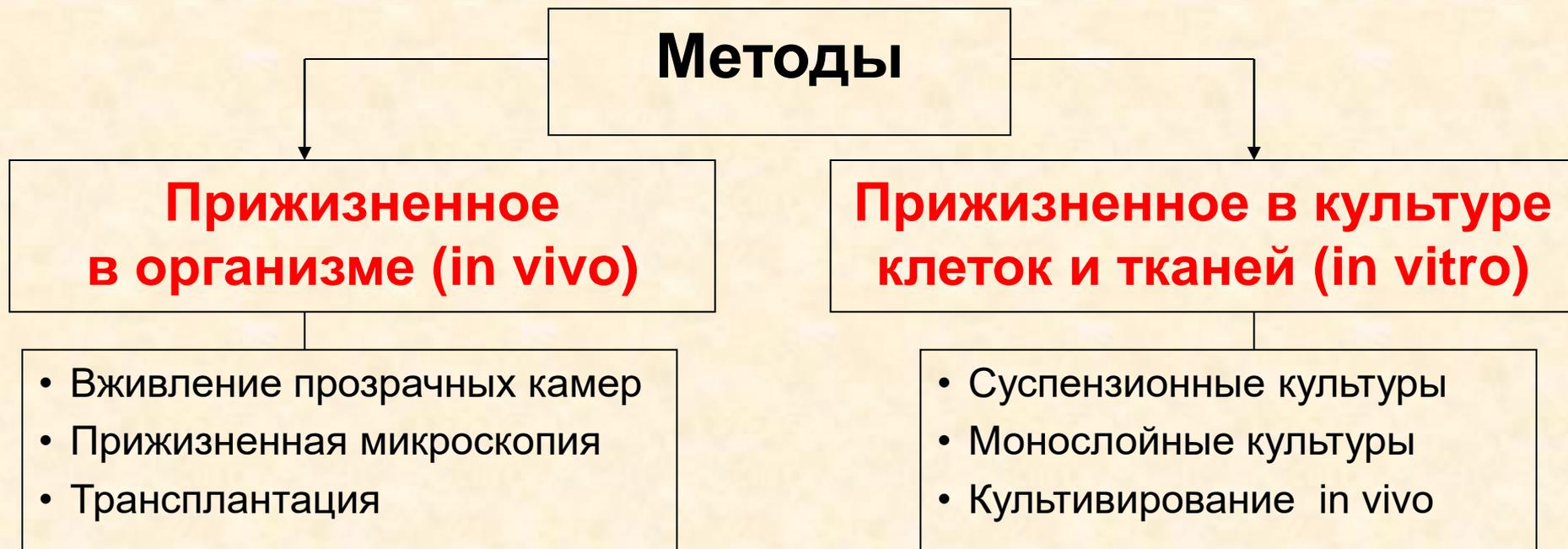
Главными этапами цитологического и гистологического анализа являются

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

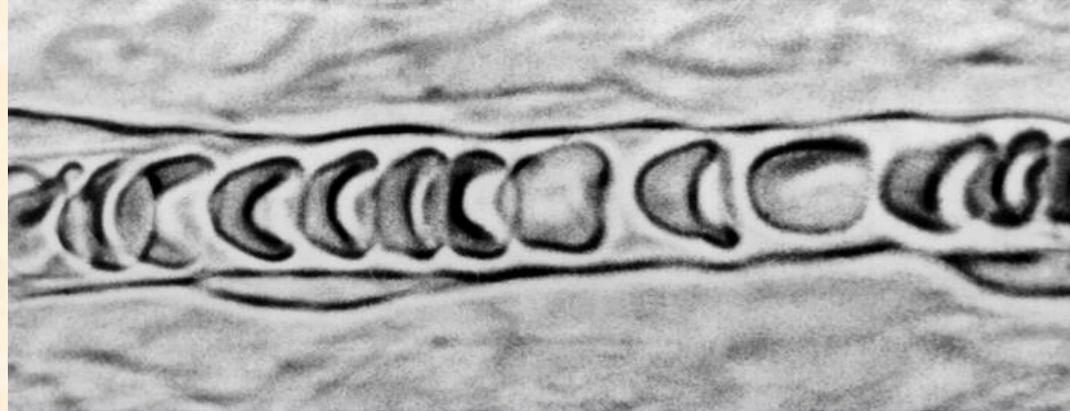
Объекты исследования представлены в виде [гистологических препаратов](#), изготовленные из [живых](#) или [фиксированных клеток](#).

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.



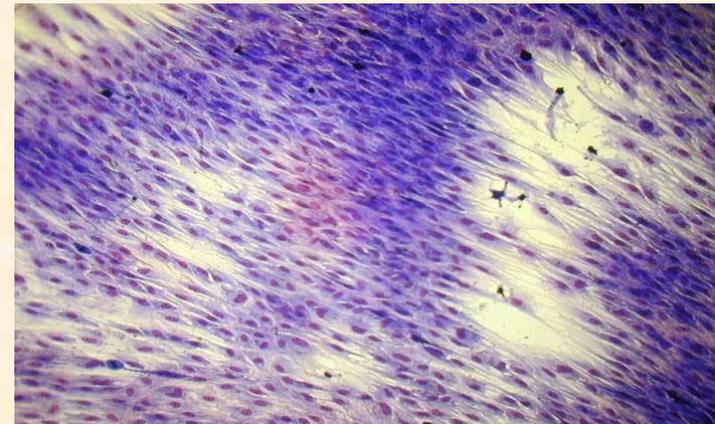
Методы исследования живых клеток и тканей (примеры 1)



Прижизненная микроскопия: поток эритроцитов в кровеносном капилляре.



Суспензионные культуры клеток

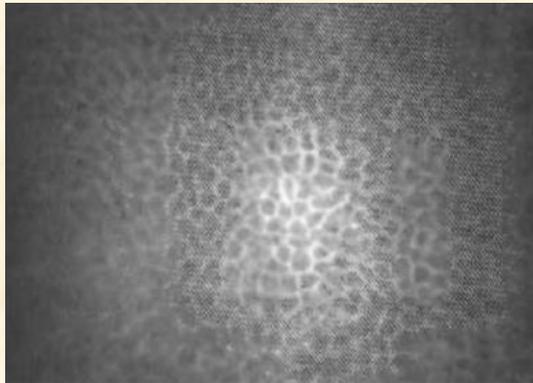


Стволовые клетки костного мозга человека в монослойных культурах клеток

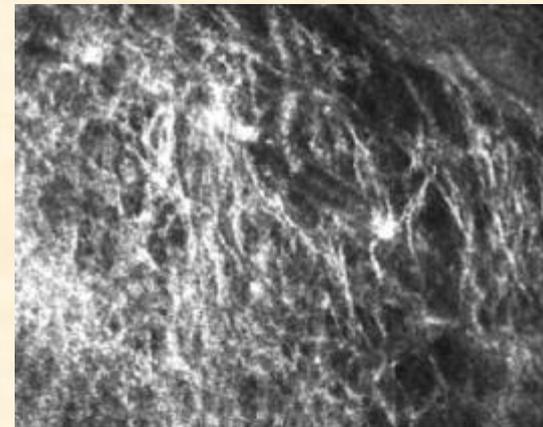
Методы исследования живых клеток и тканей (примеры 2)



Конфокальная микроскопия роговицы



Базальный слой переднего эпителия



Уплотнение субэпителиальных волокон

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.

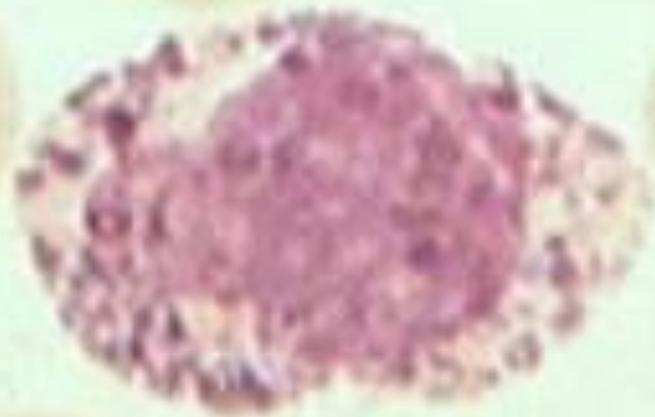
Отпечаток

- 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:

- биопсийный материал (пунктат),
- операционный материал,
- экспериментальный материал (от животных, умерщвленных специально в исследовательских целях),
- секционный (трупный) материал.



Взятие материала

При этом должны учитываться следующие моменты:

1. 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.
2. Забор кусочков должен производиться острым инструментом, чтобы не травмировать ткани.
3. Толщина кусочка не должна превышать 5 мм, чтобы фиксирующий раствор мог проникнуть в толщу кусочка.
4. 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.

Чаще всего фиксация достигается погружением кусочка в **фиксирующую жидкость**, 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 индивидуальны для различных органов и тканей и обычно колеблются 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.

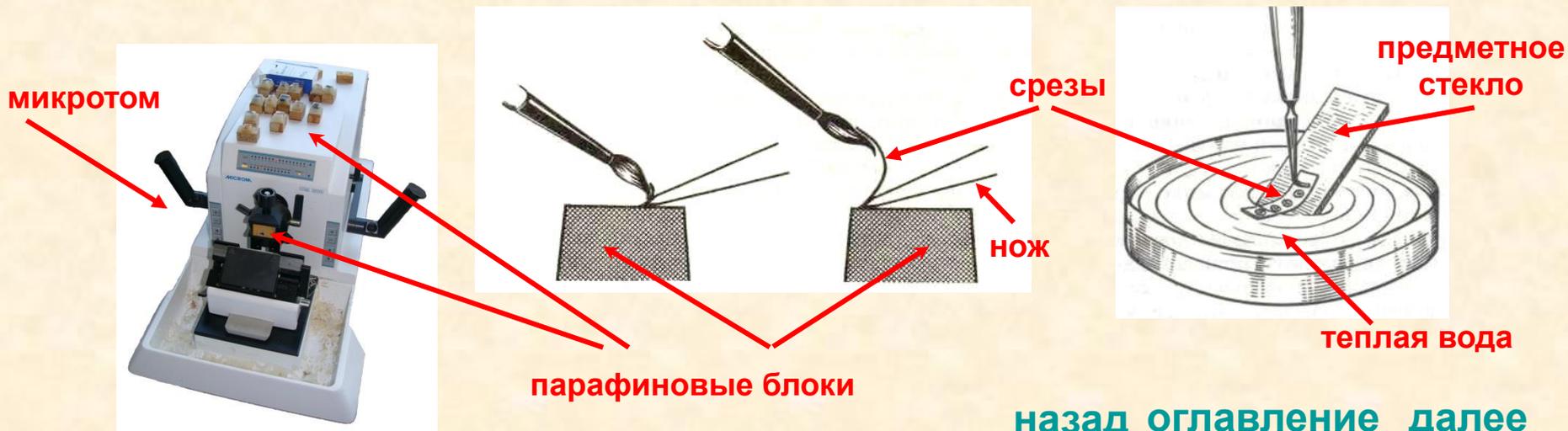
Приготовление срезов

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).



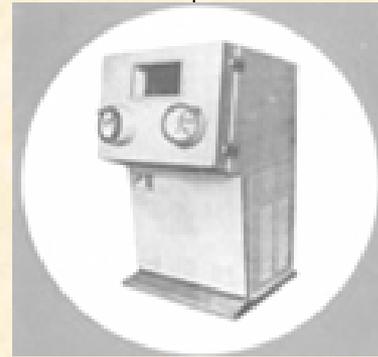
Виды микротомов

санный

ротационный

криостатный

ультрамикротом



изготовление
отдельных
парафиновых
срезов

изготовление
серийных
парафиновых
срезов

изготовление
срезов при
температуре
-20°C и ниже
для **экспресс-**
диагностики и
ГИСТОХИМИИ

изготовление
ультратонких
срезов для
электронной
микроскопии

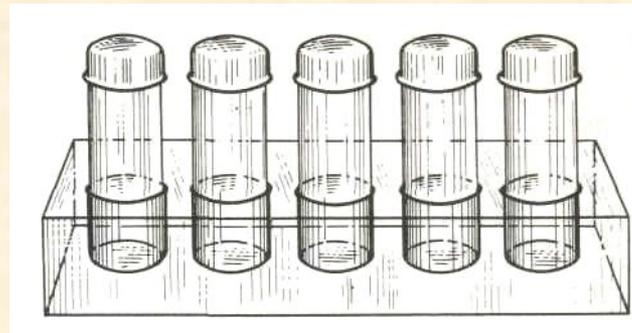
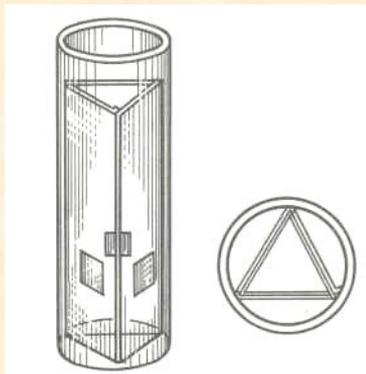
Окрашивание срезов

Клеточные структуры без специальной обработки, как правило, неразличимы 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.

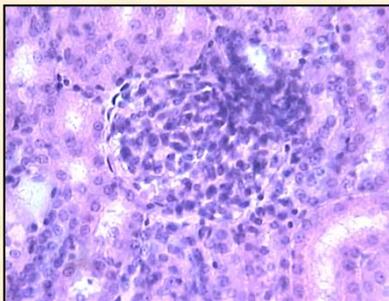
Перед окрашиванием срезы депарафинируют, проводя последовательно через растворитель парафина (ксилол), спирты нисходящей концентрации (100, 96, 90, 80, 70%) и помещают в воду.



Методы окрашивания

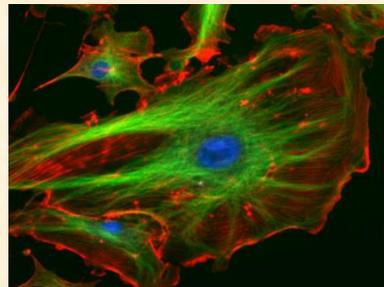
Общегисто- логические

выявление
общего плана
строения
клеток, тканей,
органов



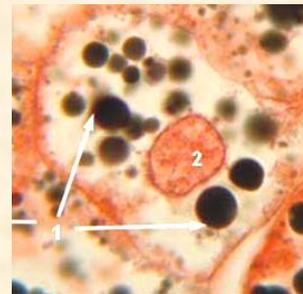
Специальные

выявление
специализи-
рованных
структур в
клетках и
тканях



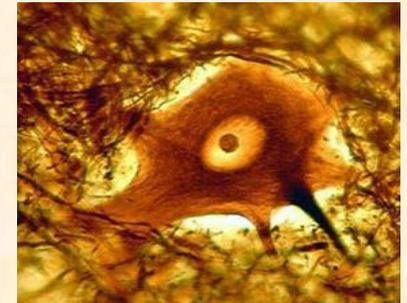
Гисто- химические

анализ
химического
состава клеток
и
межклеточного
вещества



Импрегнация

выявление
специализи-
рованных
структур в
клетках и
тканях



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

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

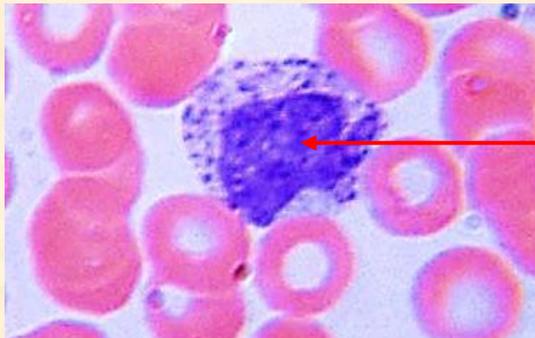
Основные (щелочные) красители активно связываются со структурами, которые содержат кислоты и несут отрицательный заряд, например, **ДНК, РНК**.

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.



Базофилия ядра
нейтрофильного гранулоцита.
Окраска по Романовскому-Гимзе.
Увеличение: х630.

Метахромазия

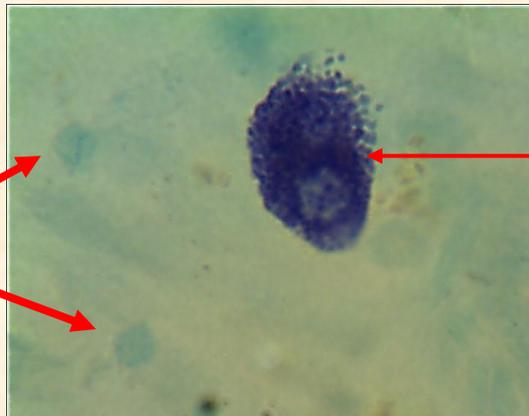
Метахромазия (от греч. meta – изменение и chroma – цвет, краска) – изменение цвета некоторых **основных** (щелочных) красителей при их связывании со структурами, обладающими специфическими химическими свойствами (обычно высокой концентрацией сульфатированных гликозаминогликанов).

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).

Базофилия ядер клеток.
Окраска толуидиновым синим.
Увеличение: х630.



Метахромазия зернистости
базофильного лейкоцита.
Окраска толуидиновым синим.
Увеличение: х630.

Оксифилия

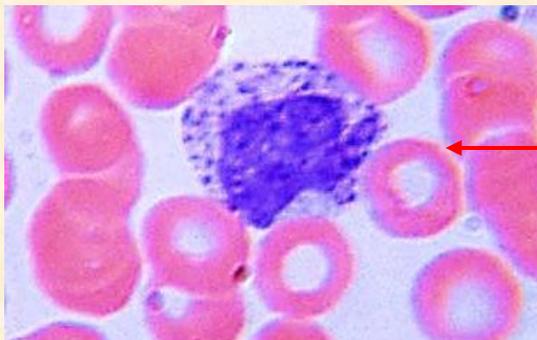
Способность окрашиваться **кислыми** красителями называется **оксифилией**, или **ацидофилией** (от греч. oxys или лат. acidus – кислый и греч. philia – любовь).

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).



Оксифилия цитоплазмы
эритроцитов.

Окраска по Романовскому-Гимзе.
Увеличение: х630.

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.

Импрегнация

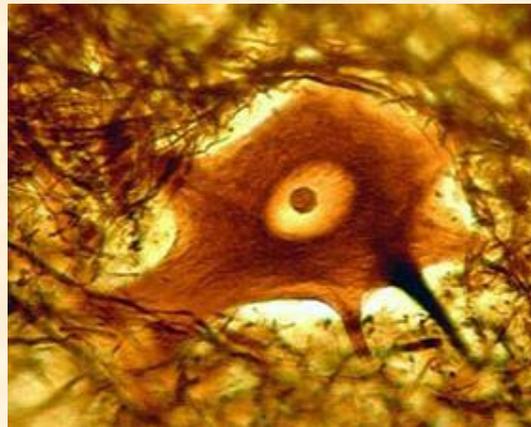
Метод выявления тканевых структур путем пропитывания объектов гистологического исследования растворами солей тяжелых и драгоценных металлов (например, азотнокислое серебро (серебрение), кобальт, хлористое золото (золочение), кадмий, осмиевым ангидрид и др.).

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

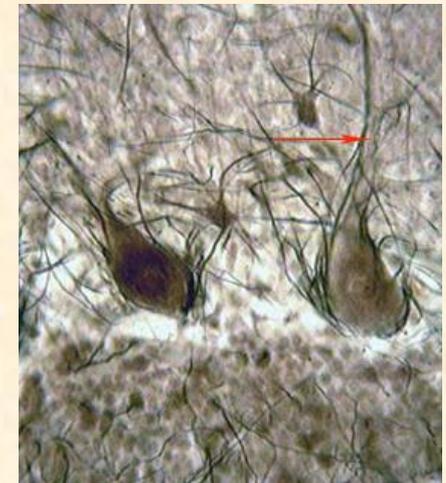
Наиболее часто применяются при изучении элементов **нервной ткани**



Периферический нерв
(поперечный срез).
Импрегнация оксидом
осмия



Мультиполярный нейрон.
Импрегнация нитратом серебра



Мультиполярные нейроны.
Импрегнация нитратом серебра

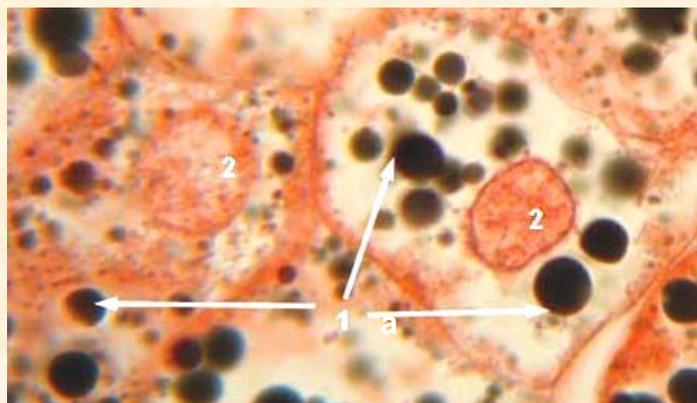
Гисто- и иммуноцитохимические методы

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.

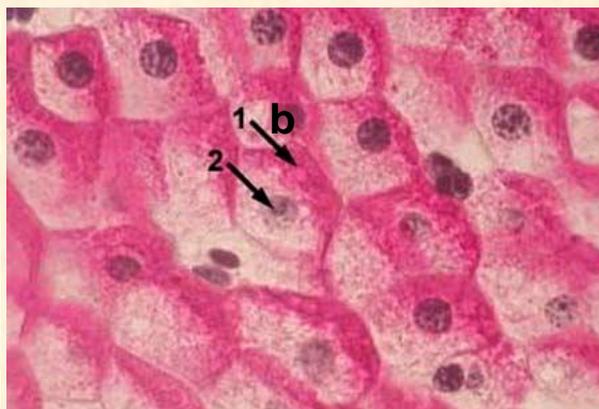
Для выявления специфических белков используют иммуноцитохимические реакции. Для этого получают специфические сыворотки, содержащие антитела (например, против белка микротрубочек — тубулина). Далее химическим путем соединяют эти антитела с флюорохромом (или другим маркером). При нанесении меченых антител 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.

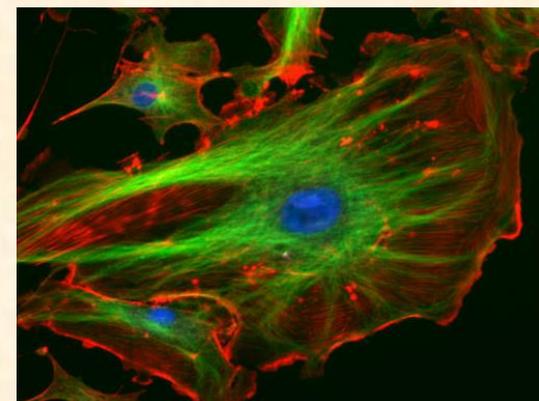
Клетки печени: 1a - включения липидов; 1b – включения гликогена; 2 – ядра



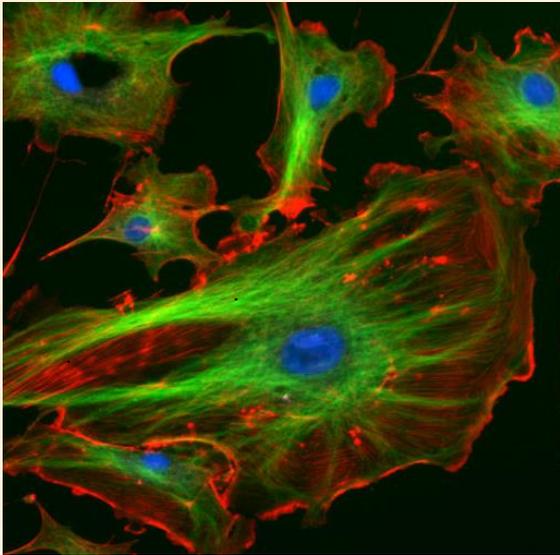
Окраска осмиевая кислота и сафранин



Окраска по Бесту

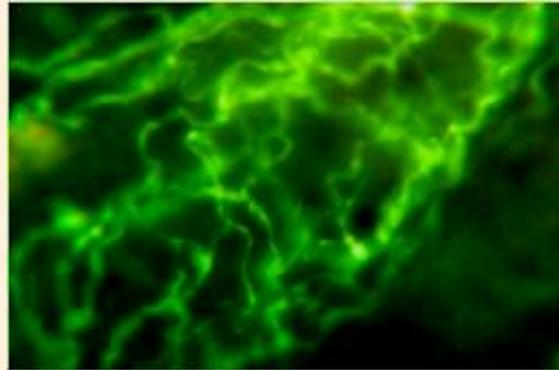


Гисто- и иммуноцитохимические методы (примеры)



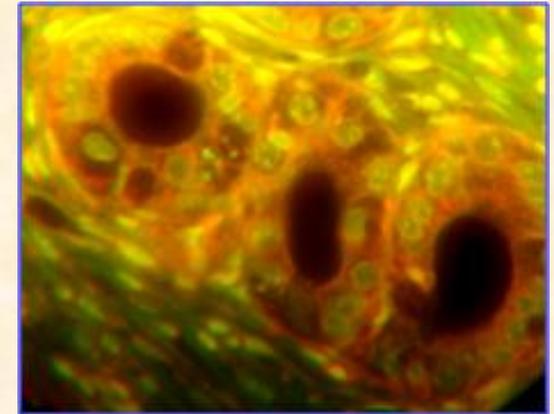
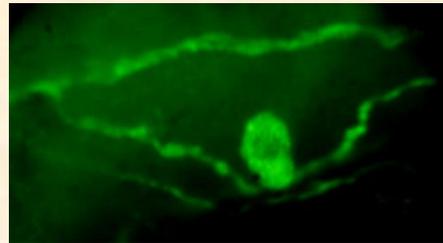
Цитоскелет эукариот
(эндотелиальные клетки быка)
Иммуноцитохимический метод
окрашивания

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.

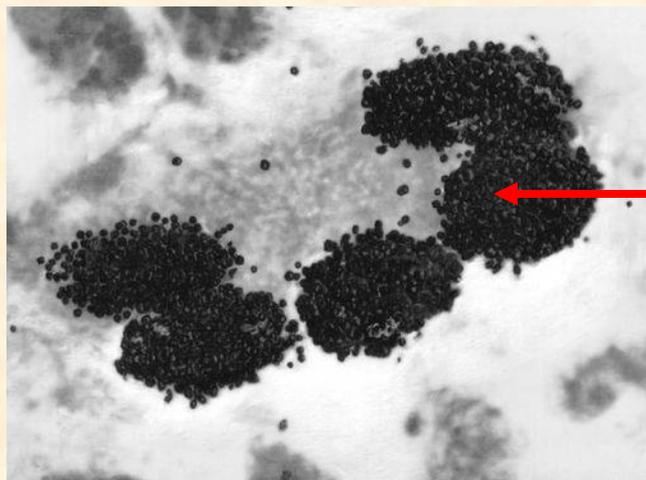
Метод радиоавтографии

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**.



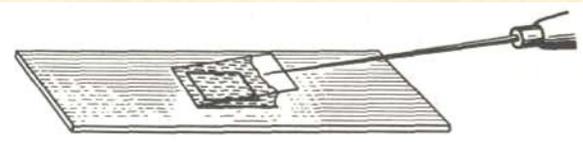
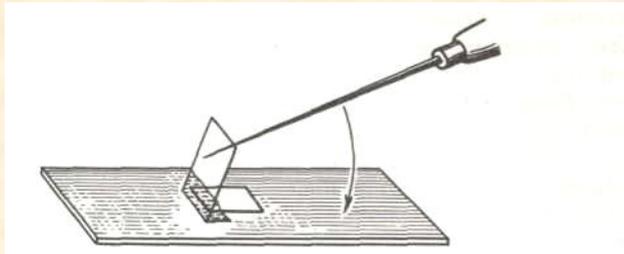
Включение в ядра клеток соединительной ткани меченного тритием тимидина, идущего на построение нуклеиновых кислот.
Увеличение x 600.

Заключение срезов в консервирующую среду

Окрашенные гистологические препараты обезвоживаются в спиртах восходящей концентрации (70, 80, 90, 96, абсолютный – 100%) и просветляются 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).

Срез ткани в постоянном гистологическом препарате располагается на **предметном стекле**, сверху закрыт **покрывным стеклом**. Между стеклами (предметным и покрывным) находится заливочная среда, обладающая коэффициентом преломления световых лучей, близким к коэффициенту преломления у стекла.





Методы микроскопии

Методы микроскопии

Оптическая

Световая

Поляриза-
ционная

Флюоресцентная
(люминесцентная)

Темно-
польная

Фазово-
контраст-
ная

Электронная

Просвечивающая
(трансмиссионная)

Сканирующая
(растровая)

Световая микроскопия

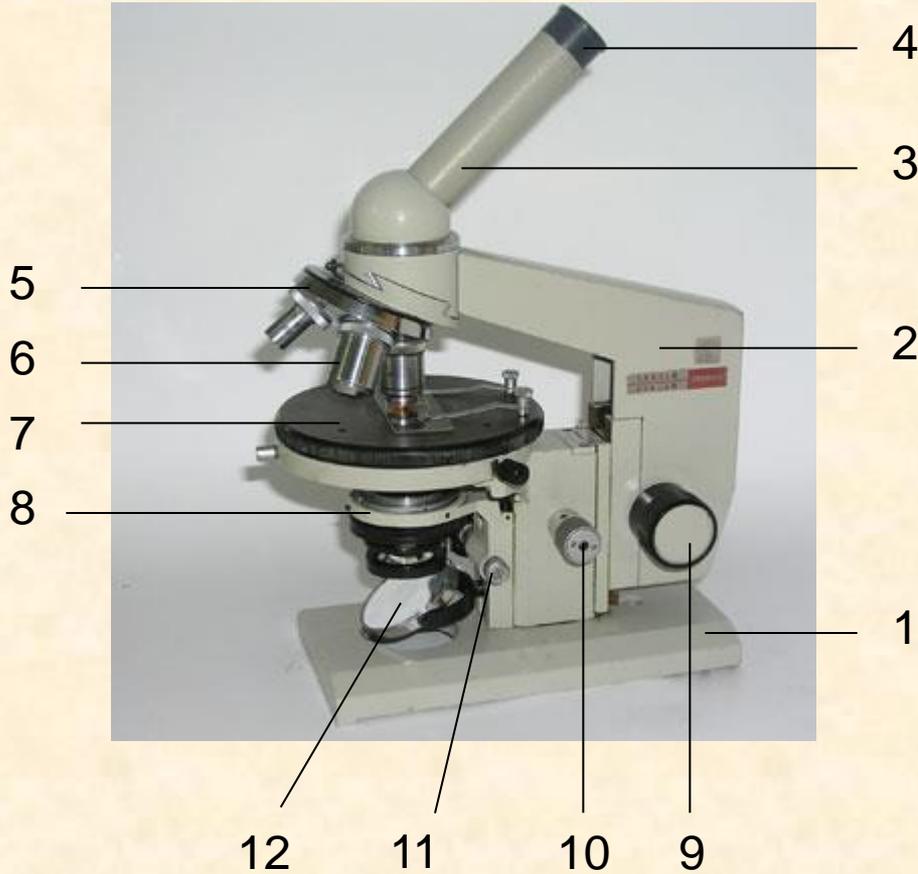
Изучение гистологического препарата осуществляется в проходящем свете с помощью [светового микроскопа](#). Максимальное увеличение светового микроскопа не превышает 2000-2500 раз.

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 отдельно 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. Ориентировочно оно оценивается как произведение увеличений [объектива](#) и [окуляра](#) и может достигать 2500 раз.

Устройство светового микроскопа



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

Общее увеличение микроскопа = увеличение объектива \times увеличение окуляра

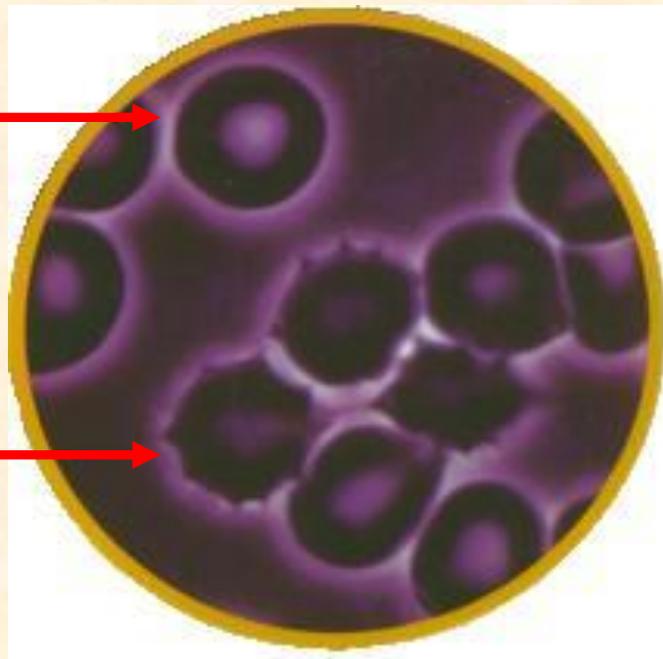
Темнопольная микроскопия

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.

Дискоцит



Мазок крови человека



Эхиноцит



Поляризационная микроскопия

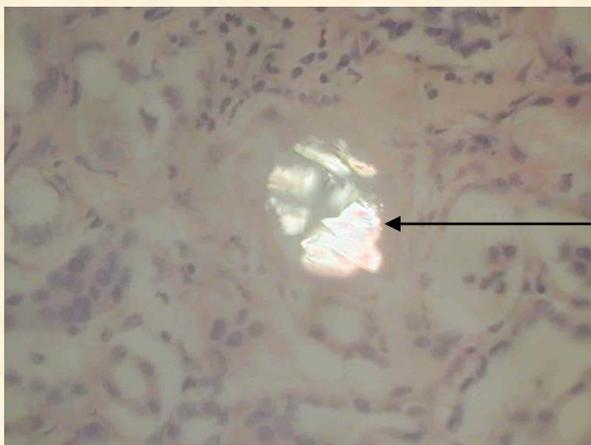
Позволяет обнаружить двойное лучепреломление – анизотропию.

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 или кристаллических структур в объекте.



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

Фазово-контрастная микроскопия

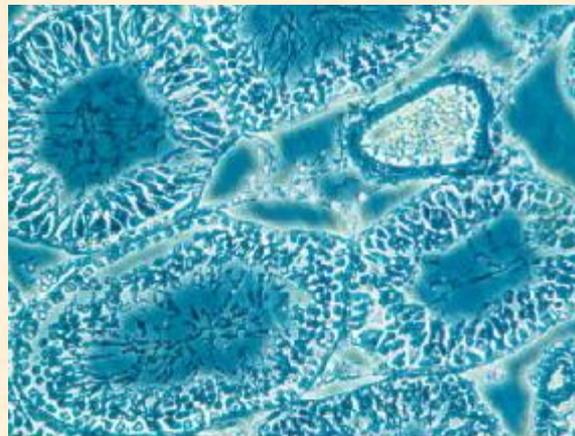
Метод служит для получения контрастных изображений прозрачных и бесцветных объектов, в частности, позволяет изучать живые неокрашенные препараты.

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.

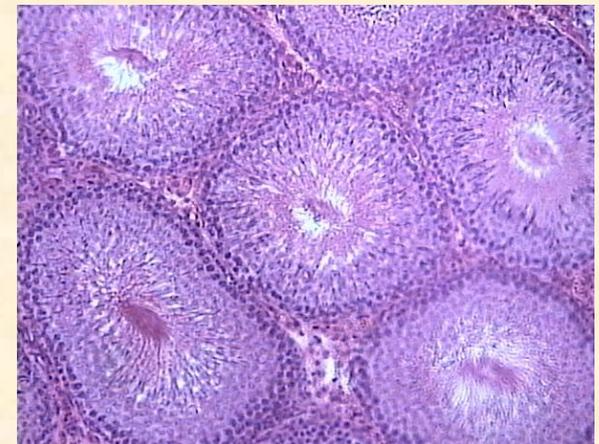
Иными словами, в получаемом видимом изображении распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным.



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.

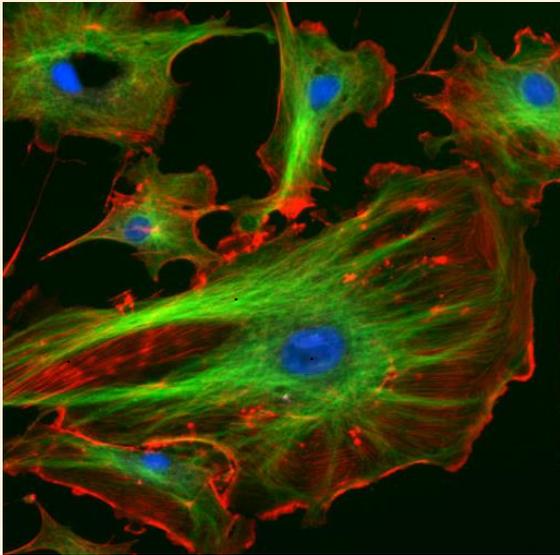
Вторичная флюоресценция возникает после обработки препаратов специальными красителями – **флюорохромами** (акридин оранжевый, родамин, флюоресцин и др.).

Например, после обработки **акридиновым оранжевым** 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 **иммуоцитохимического**.

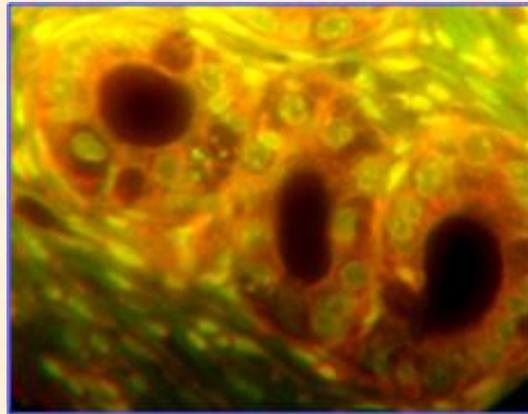
[назад](#) [оглавление](#) [далее](#)

Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия (примеры)



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

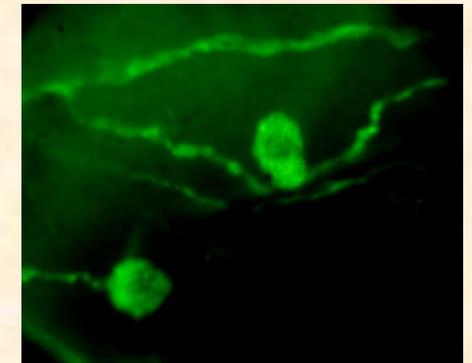
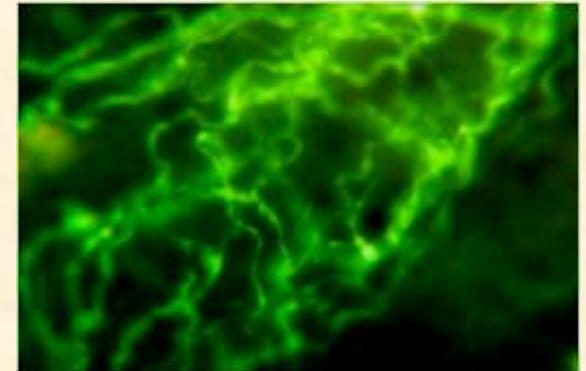
Актиновые микрофиламенты
окрашены в красный,
микротрубочки — в зеленый, ядра
клеток — в голубой цвет.



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).

[к задаче 2](#)

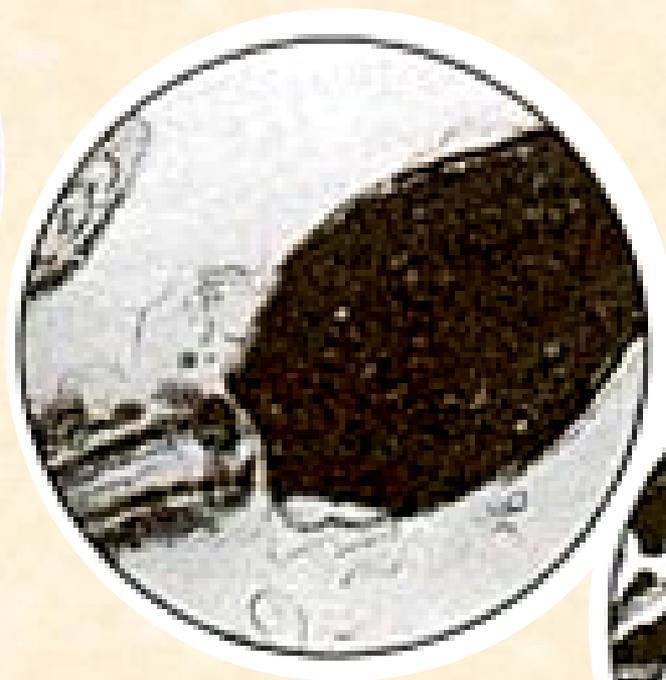
[к задаче 3](#)

[назад](#)

[оглавление](#)

[далее](#)

Электронная микроскопия



[к задаче 2](#)

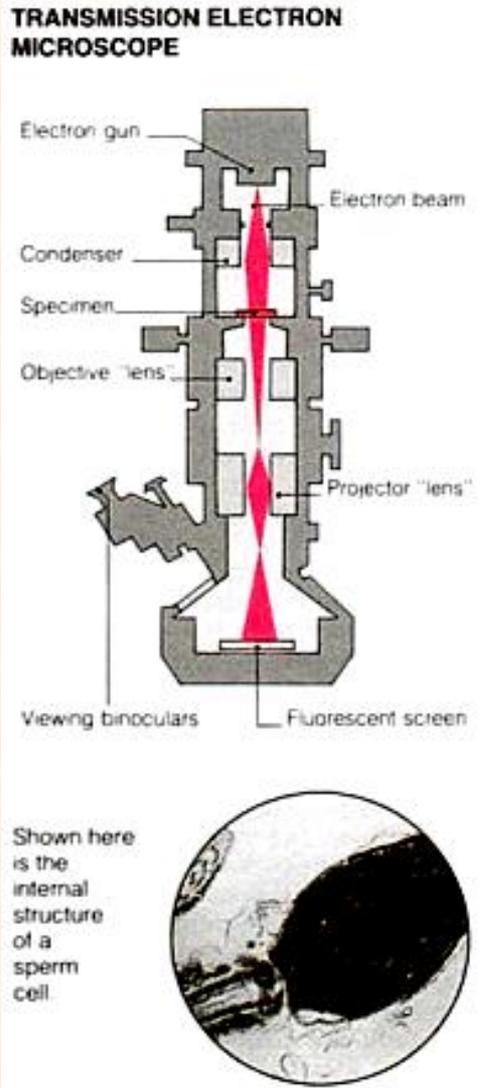
[к задаче 3](#)

[назад](#)

[оглавление](#)

[далее](#)

Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия

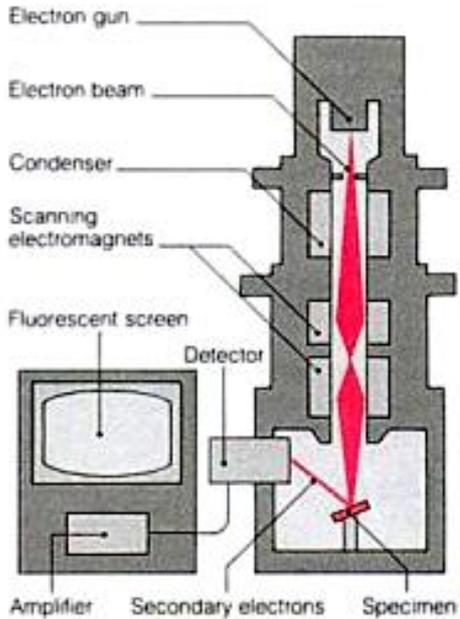


Принцип работы трансмиссионного электронного микроскопа заключается в том, что электроны, проходя через объект, расположенный вблизи объективной линзы, взаимодействуют с его атомами и отклоняются от первоначального направления падения пучка (рассеиваются). Далее они попадают в систему магнитных линз, 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

SCANNING ELECTRON MICROSCOPE



Shown here is the surface structure of sperm cells.



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.

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

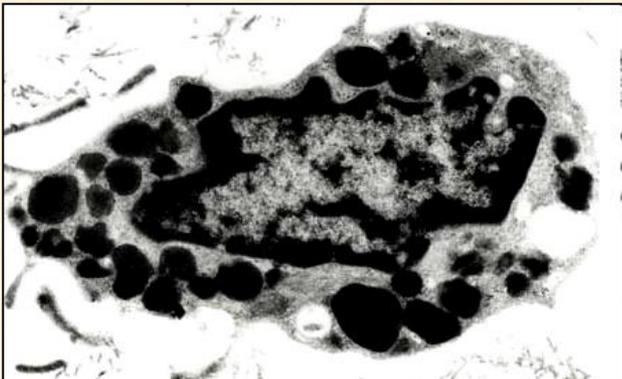
В СЭМ пучок электронов (электронный зонда) фокусируется электромагнитными линзами конденсора и объектива. Специальное устройство – дефлектор отклоняет электронный пучок (первичные электроны), который скользит по поверхности (растр). Вторичные электроны (отраженные от поверхности) воспринимаются детектором 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.

[к задаче 2](#) [к задаче 3](#) [назад](#) [оглавление](#) [примеры](#)

Электронная микроскопия (примеры)

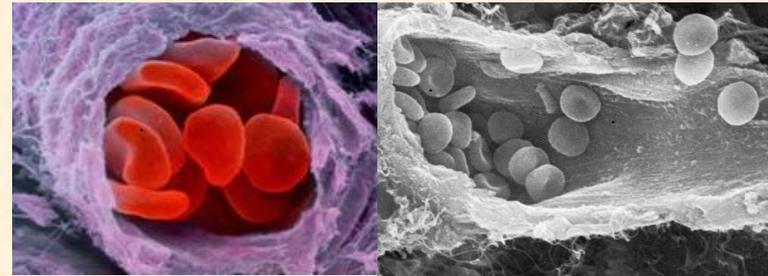
трансмиссионная



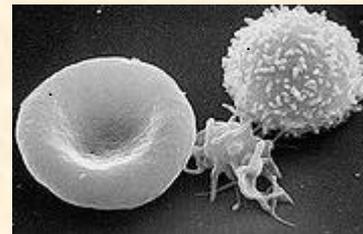
Тучная клетка



сканирующая



Эритроциты в артериоле



Эритроцит,
тромбоцит,
лейкоцит

Ситуационная задача 1

Перед исследователем два гистологических препарата отпечатков с поверхности слизистой оболочки ротовой полости. Отпечатки фиксированы над пламенем спиртовки и окрашены стандартной смесью основного и кислого красителя. С помощью светового микроскопа на первом препарате выявлена группа клеток с базофильным ядром и оксифильной цитоплазмой, на втором преобладают клетки с базофильным ядром и базофильной цитоплазмой.

В КАКИХ КЛЕТКАХ ПРЕОБЛАДАЮТ ПРОЦЕССЫ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА? ОБОСНУЙТЕ ВАШ ОТВЕТ.

Ответ: в клетках с базофильной цитоплазмой и базофильным ядром.

Обоснование: **базофилия** цитоплазмы (окрашивание основными (щелочными) красителями) обусловлена кислой реакцией цитоплазмы вследствие содержания в ней большого количества РНК в составе рибосомом (свободных или гранулярной ЭПС), которые и обеспечивают процессы белкового синтеза в клетке.

Ситуационная задача 2

Перед исследователем поставлены задачи – в ходе гистологического анализа материала, полученного от экспериментального лабораторного животного:

1) выявить изменения ядерно-цитоплазмических отношений в гепатоцитах (клетках печени);

2) выявить изменения структуры кариолеммы в гепатоцитах.

С ПОМОЩЬЮ КАКИХ МЕТОДОВ МИКРОСКОПИИ БУДУТ РЕШАТЬСЯ ЭТИ ЗАДАЧИ? ОБОСНУЙТЕ ВАШ ОТВЕТ.

Ответ:

1) для выполнения задания №1 необходимо использовать метод световой микроскопии, т.к. его сравнительно небольшие **разрешающая способность** и **увеличение** позволят получить изображение клетки и ее основных структурных компонентов (ядра и цитоплазмы) в целом;

2) для выполнения задания №2 необходимо применить метод электронной микроскопии, т.к. его **разрешающая способность** и **увеличение** обеспечивают изучение ультраструктурных компонентов клетки, к которым, в частности, относится кариолемма.

Ситуационная задача 3

В научных целях в эксперименте необходимо изучить особенности иннервации пульпы зуба после применения нового стоматологического метода лечения. Исследователю предстоит выявить в пульпе и оценить состояние нервных волокон и нервных окончаний.

1. КАКИЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ НЕОБХОДИМО ПРИМЕНИТЬ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПОСТАВЛЕННОЙ ЗАДАЧИ?
2. КАКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЫЯВЛЕНИЯ СТРУКТУР ЛЕЖАТ В ОСНОВЕ ЭТИХ МЕТОДОВ?
3. С ПОМОЩЬЮ КАКОГО МЕТОДА МИКРОСКОПИИ (СВЕТОВОГО ИЛИ ЭЛЕКТРОННОГО) БУДУТ ПРОВОДИТЬСЯ ИССЛЕДОВАНИЯ?
4. УКАЖИТЕ РАЗРЕШАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ ЭТОГО МИКРОСКОПА.
5. УКАЖИТЕ ГРАНИЦУ МАКСИМАЛЬНОГО УВЕЛИЧЕНИЯ ЭТОГО МИКРОСКОПА.

Ответ:

1. импрегнации;
2. осаждение и восстановление солей тяжелых и драгоценных металлов на гистологических структурах;
3. световой микроскопии;
4. 0,2 мкм;
5. 2000 – 2500 раз.

Рекомендуемая литература

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Гистология, цитология и эмбриология: Учебник. / Под ред. Ю.А.Афанасьева, С.Л.Кузнецова, Н.А.Юриной. – М.: Медицина, 2006. – 768 с.
- Гистология, эмбриология, цитология: Учебник. / Под ред. Э.Г.Улумбекова, Ю.А.Челышева. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2007. – 408 с.

Дополнительная литература

- Гистология человека в мультимедиа. Учебник под редакцией Р.К.Даниллова, А.А Климova, Т.Г.Боровой. – СПб: ЭЛБИ, 2004. – 362 с.
- Гистология: комплексные тесты: ответы и пояснения: учебное пособие для мед. Вузов России /Под ред. С.Л.Кузнецова, Ю.А.Челышева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 288 с.
- Жункейра Л.К., Карнейро Ж. Гистология: Атлас: Уч.пос.; пер. с англ., под ред. В.Л. Быкова. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2009. – 576 с.
- Микропрепараты по цитологии и общей эмбриологии (электронное обучающе-контролирующее учебное пособие) [Электронный ресурс] / С.В. Диндяев, С.Ю. Виноградов. - Иваново: ГОУ ВПО ИвГМА Росздрава, 2009. – 1 CD-ROM. – № гос. регистрации 0320901242. - 29,9 Мб. (<http://isma.ivanovo.ru/gistologiya/>)
- Микропрепараты по общей гистологии (электронное обучающе-контролирующее учебное пособие) [Электронный ресурс] / С.В. Диндяев, С.Ю. Виноградов. - Иваново: ГОУ ВПО ИвГМА Росздрава, 2009. – 1 CD-ROM. – № гос. регистрации 0320902090. – 41,1 Мб. (<http://isma.ivanovo.ru/gistologiya/>)
- Хэм А., Кормак Д. Гистология: в 5 томах; пер. с англ. – М.: Мир, 1982.