



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

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии

1

**Материалы и методы
цитогистологического исследования.
Анализ гистологических препаратов
Часть 2**

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

[назад](#)

[далее](#)

Оглавление

Качественный и количественный анализ гистологических препаратов

Интерпретация формы сечения объекта

Качественный анализ гистологических препаратов

Количественный анализ гистологических препаратов

Техническое оснащение морфометрических исследований

Автоматизация морфометрических исследований

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

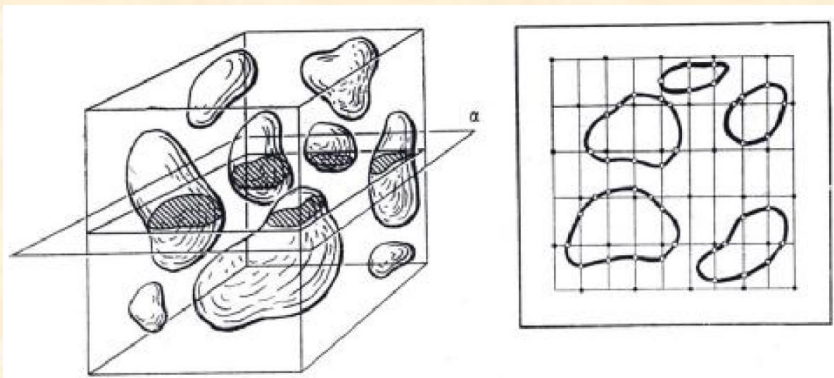
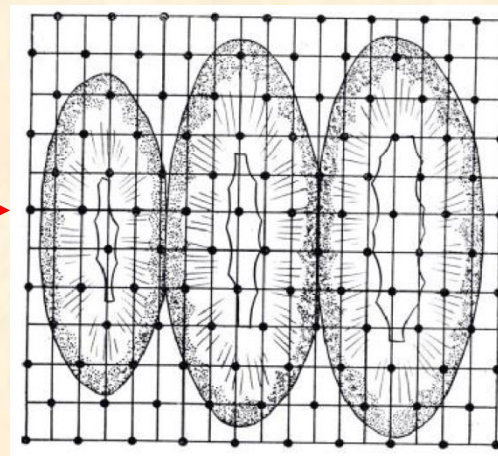
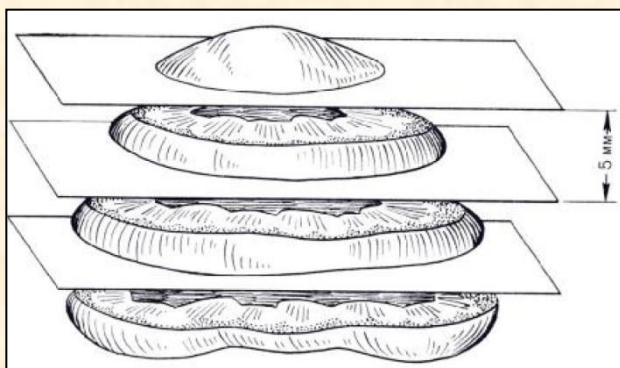
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Анализ гистологических препаратов

Анализ гистологических препаратов

Морфометрические методы

Стереометрия
(в объеме)
позволяют провести
трехмерную реконструкцию
объекта



Качественный анализ гистологических препаратов

Исследование химического состава клеток и тканей

Цитохимические методы

Гистохимические методы

Имунохимические методы

Основаны на специфичности реакции между химическим реактивом (или антителом) и субстратом, находящимся в клетках и тканях

Исследование метаболизма клеток и тканей

Метод радиоавтографии

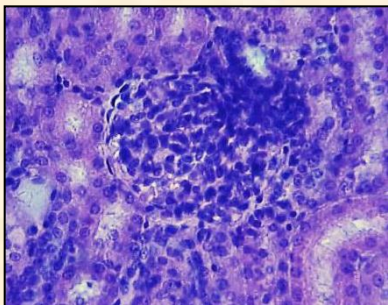
Выявление распределения веществ, меченных радиоактивными изотопами (^3H , ^{14}C , ^{32}P и др.) в клетках и тканях

Обзорная микроскопия

Методы окрашивания

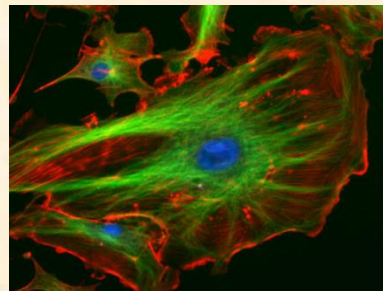
Общегисто- логические

выявление
общего плана
строения
клеток, тканей,
органов



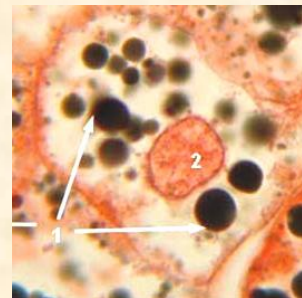
Специальные

выявление
специализи-
рованных
структур в
клетках и
тканях



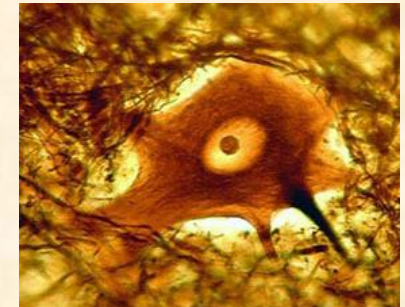
Гисто- химические

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).

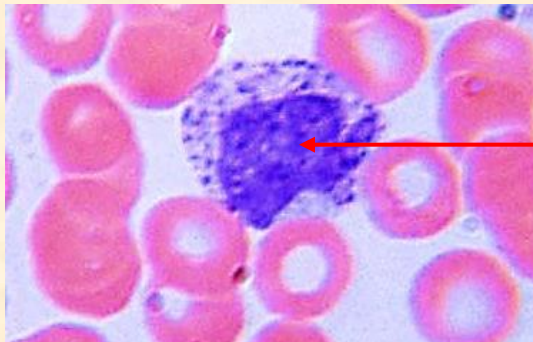
Основные (щелочные) красители активно связываются со структурами, которые содержат кислоты и несут отрицательный заряд, например, **ДНК, РНК**.

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

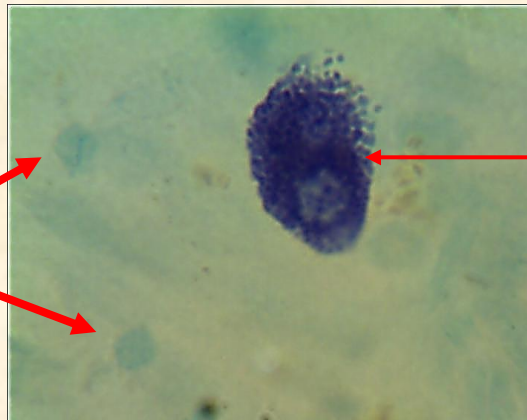
Метахромазия (от греч. meta – изменение и chroma – цвет, краска) – изменение цвета некоторых **основных** (щелочных) красителей при их связывании со структурами, обладающими специфическими химическими свойствами (обычно высокой концентрацией сульфатированных гликозаминогликанов).

К таким красителям относятся толуидиновый синий, азури 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

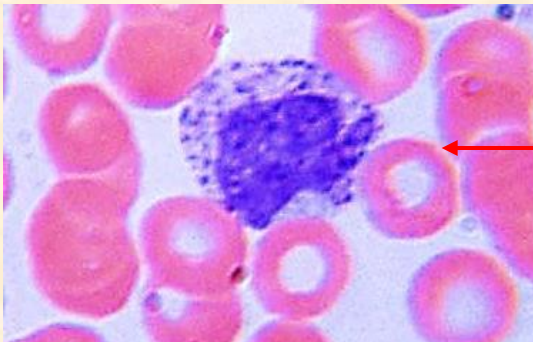
Способность окрашиваться **кислыми** красителями называется **оксифилией**, или **ацидофилией** (от греч. oxys или лат. acidus – кислый и греч. philia – любовь).

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.

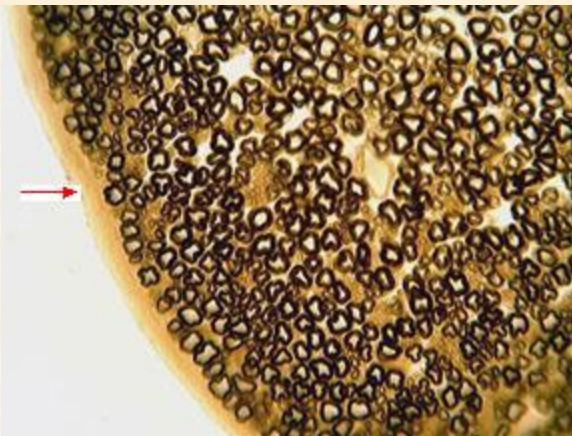
Увеличение: x630.

Импрегнация

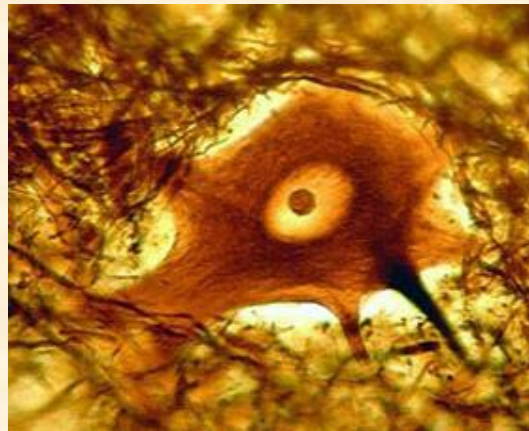
Метод выявления тканевых структур путем пропитывания объектов гистологического исследования растворами солей тяжелых и драгоценных металлов (например, азотнокислое серебро (серебрение), кобальт, хлористое золото (золочение), кадмий, осмиевым ангидрид и др.).

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

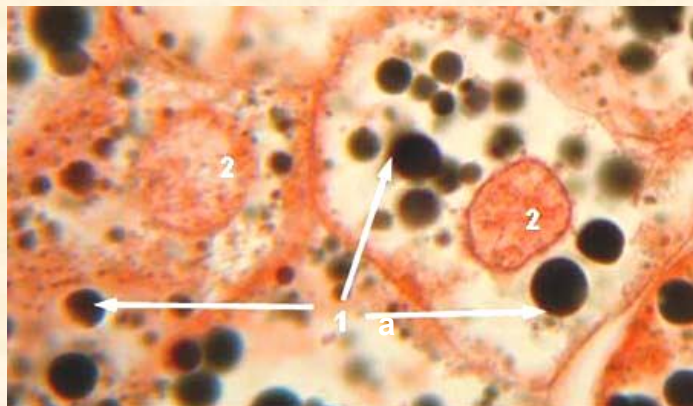
Гисто- и иммуноцитохимические методы

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.

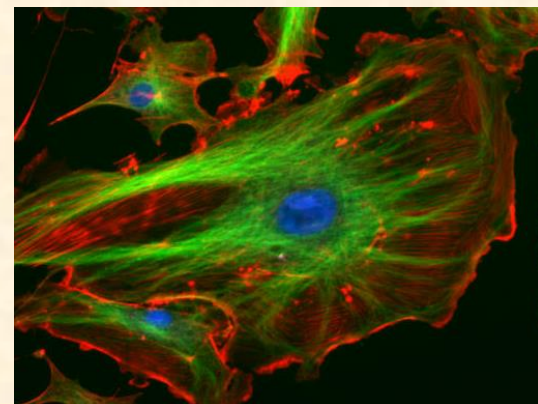
Клетки печени: 1a - включения липидов; 1b – включения гликогена; 2 – ядра



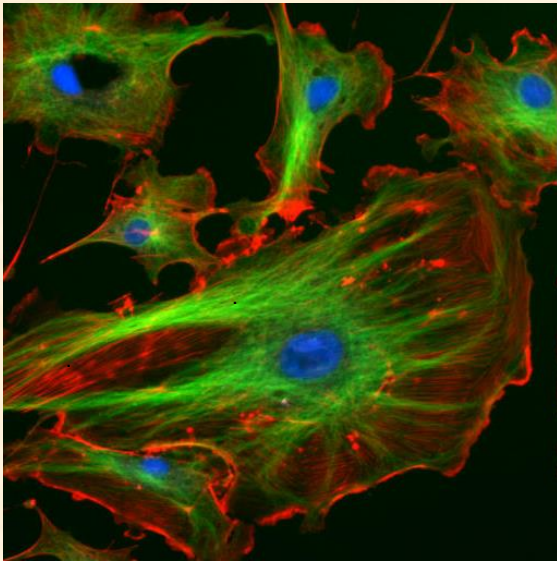
Окраска осмиевая кислота и сафранин



Окраска по Бесту

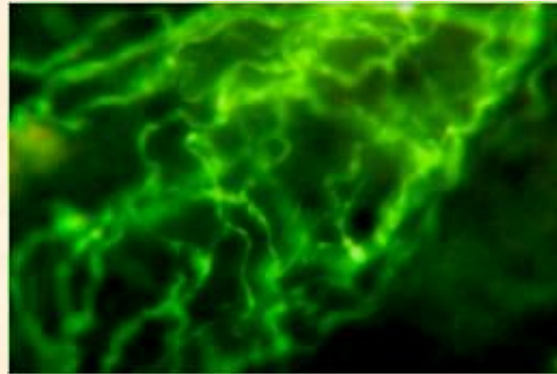


Гисто- и иммуноцитохимические методы (примеры)



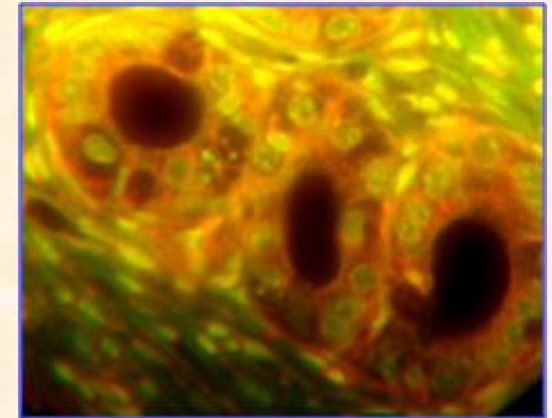
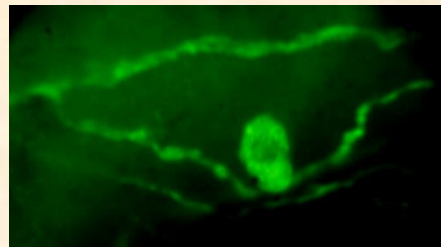
Цитоскелет эукариот
(эндотелиальные клетки быка)
Иммуноцитохимический метод
окрашивания

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.

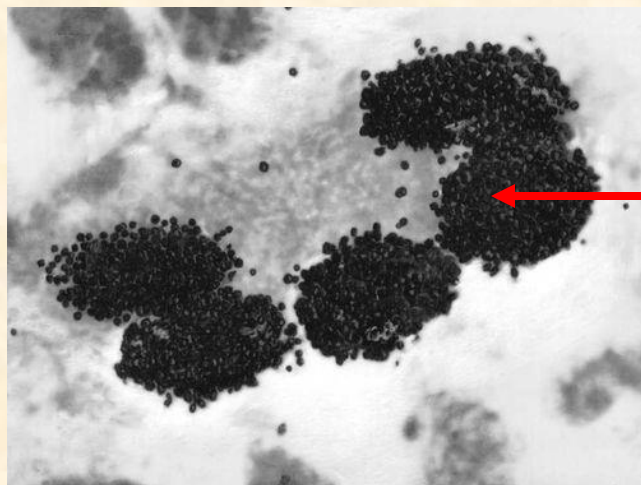
Метод радиоавтографии

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.

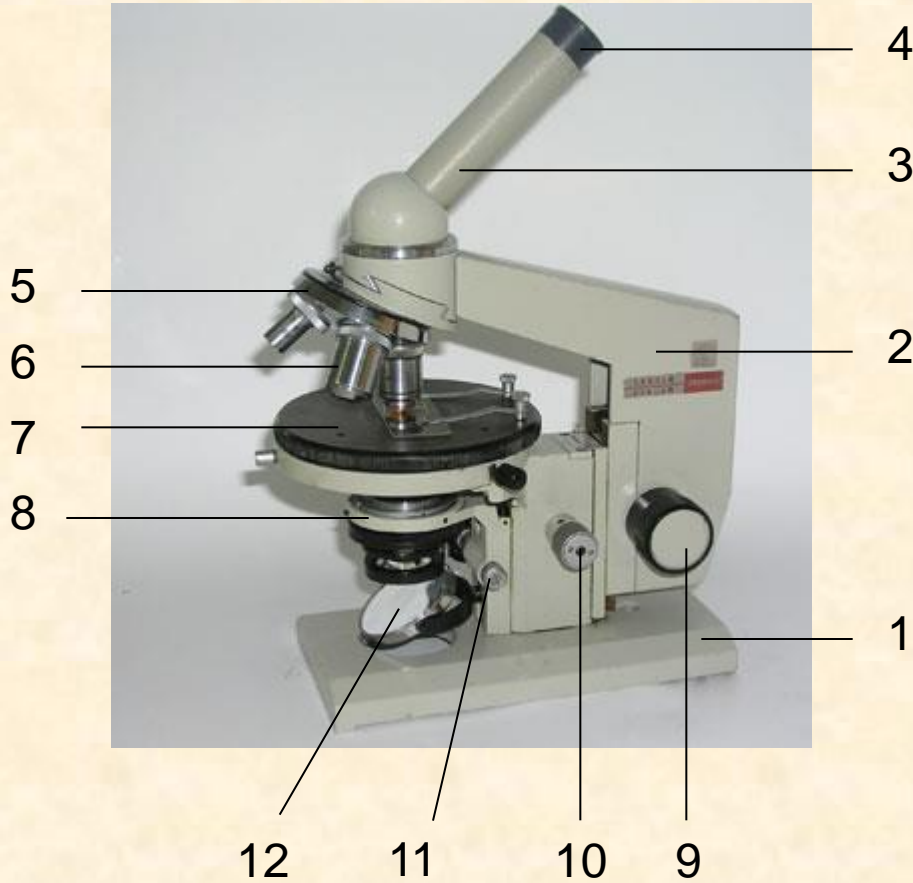
Так, например, применение **радиоактивного фосфора** дало возможность обнаружить присутствие интенсивного обмена веществ в растущей кости; применение **радиоактивных изотопов иода** позволили уточнить закономерности деятельности щитовидной железы; введение **меченых тритием предшественников нуклеиновых 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.

Устройство светового микроскопа



1. Основание микроскопа
2. Тубусодержатель
3. Тубус
4. Окуляр (чаще $\times 7$)
5. Револьвер 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

Техника микроскопирования

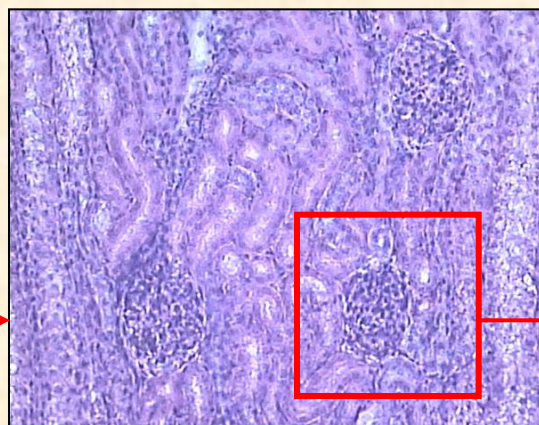
1. Микроскопирование гистологического препарата начинают с установки правильного **освещения**. Для этого с помощью вогнутого зеркала, собирающего рассеянный пучок света, и конденсора достигают равномерного освещения поля зрения.
2. На предметный столик помещают гистологический препарат покровным стеклом 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.

Обзорная микроскопия с помощью объективов различного увеличения

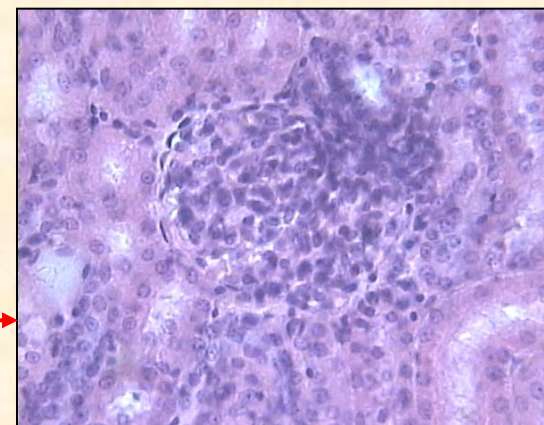
Используется для выявления общего плана строения органов, тканей, клеток.



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

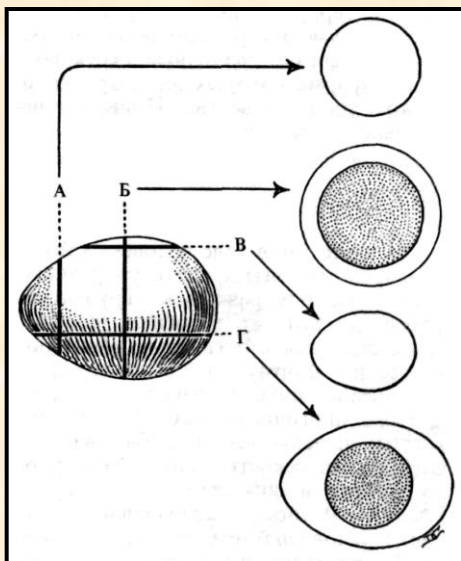


Почка. Кортикальное вещество.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: x 280
(большое увеличение).

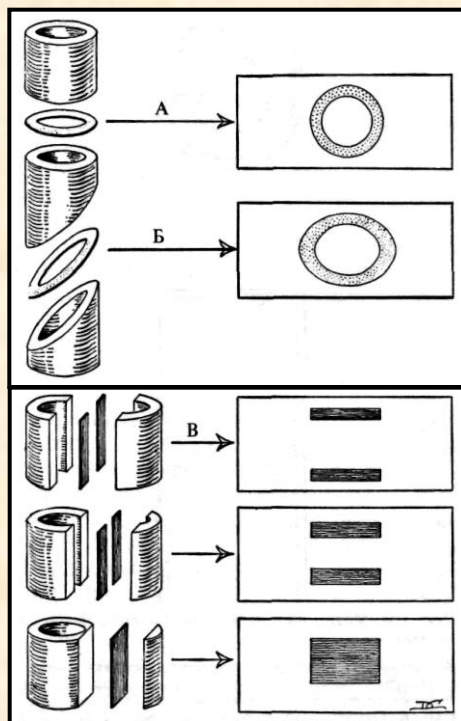


Почка. Почечное тельце.
Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: x 630
(иммерсионное увеличение).

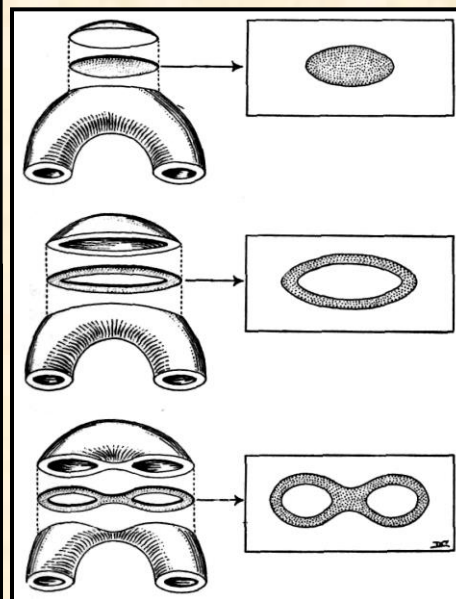
Интерпретация формы сечения объекта



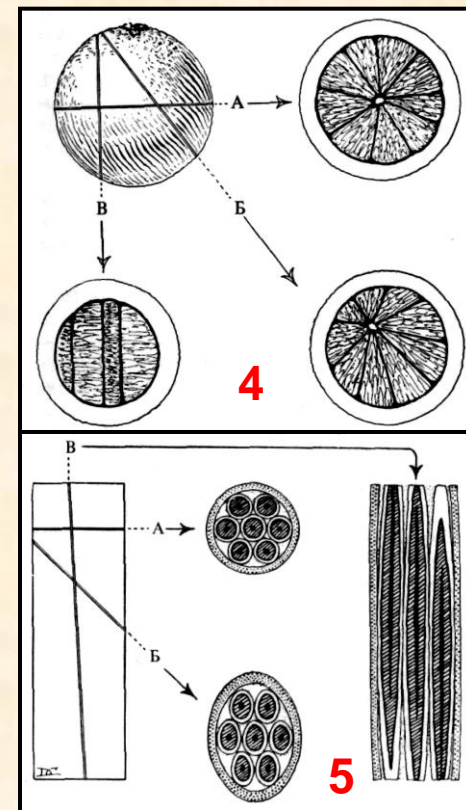
1



2



3



4

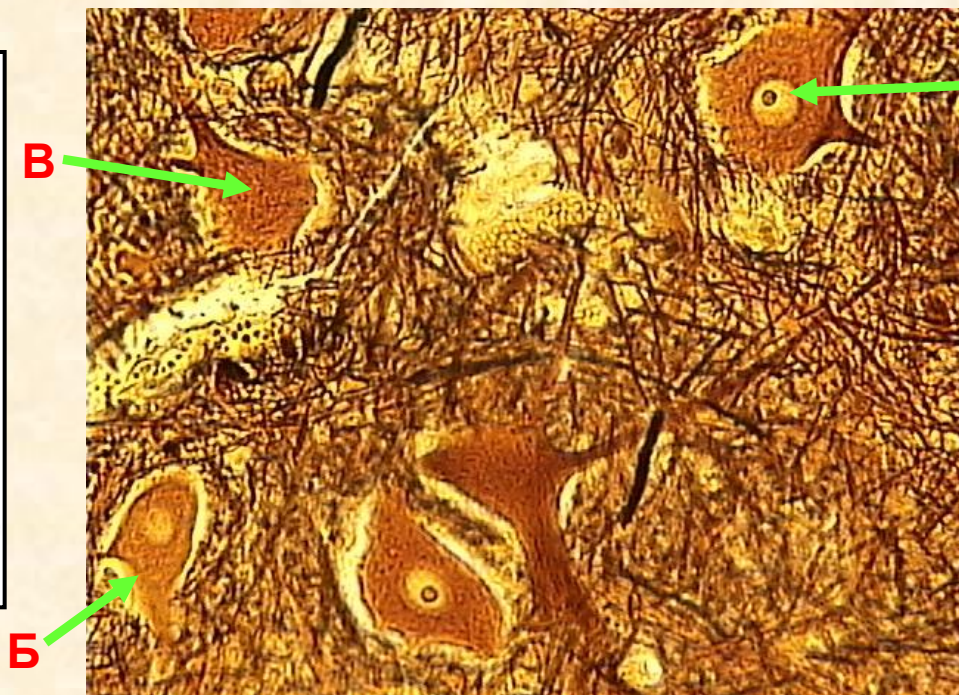
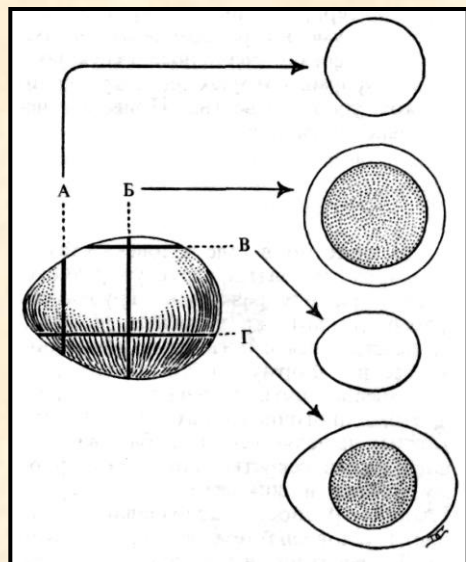
5

Схемы срезов, сделанных в разных плоскостях через объекты различной формы

(из Хэм А., Кормак Д. Гистология: в 5 томах; пер. с англ. – М.: Мир, 1982):

1. [Яйцо](#)
2. [Прямые трубки](#)
3. Изогнутые трубки
4. Объект, разделенный перегородками (апельсин)
5. Электрический кабель, состоящий из множества изолированных проводов

Интерпретация формы сечения объекта (пример 1)



Спинальный мозг. Мультиполярные нейроны. Увеличение x280.

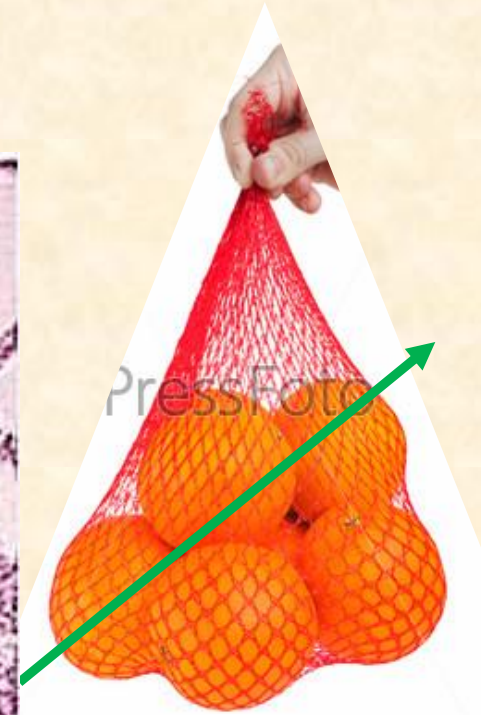
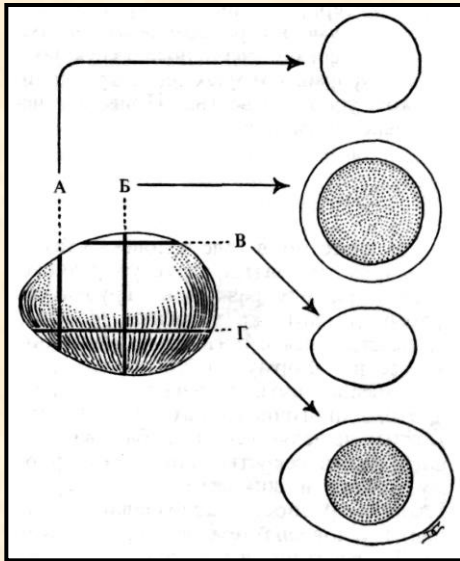
Толщина среза 6 мкм. Размеры клеток 100-140 мкм.

Микрофотография демонстрирует различные участки клеток, попавших в срез:

А – цитоплазма, ядро и ядрышко; Б – цитоплазма и ядро;

В – только цитоплазма.

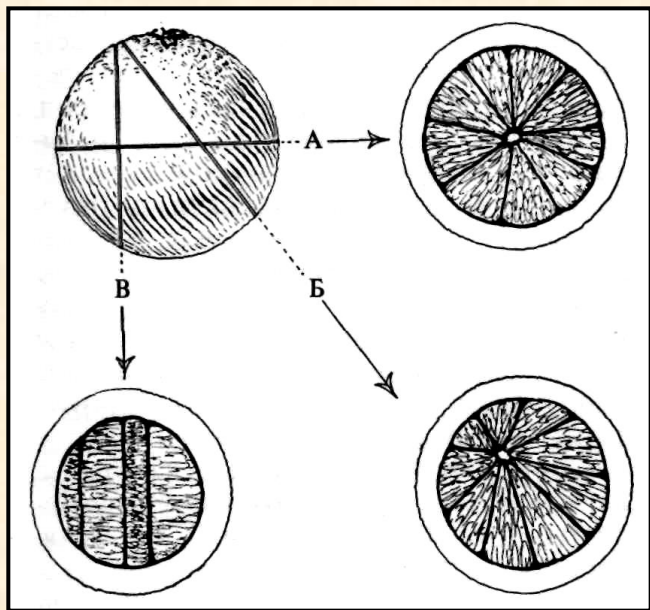
Интерпретация формы сечения объекта (пример 2)



Щитовидная железа. Увеличение x56.

Микрофотография демонстрирует различные участки фолликулов, попавших в срез:
1 – центр фолликула; 2 – краевая зона фолликула.

Интерпретация формы сечения объекта (пример 3)



А

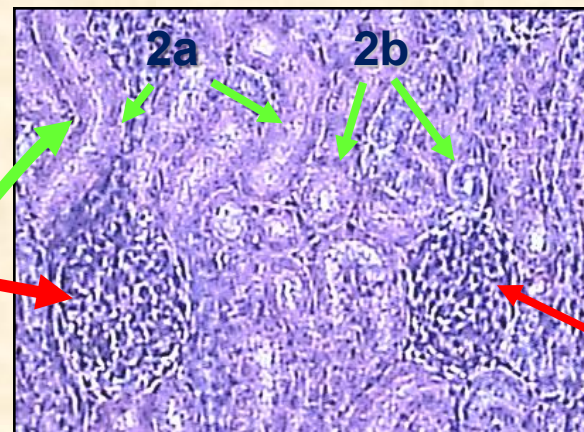
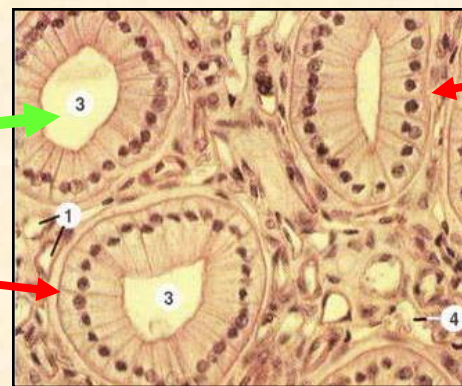
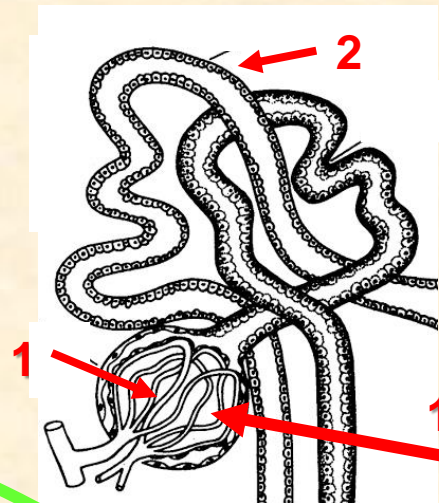
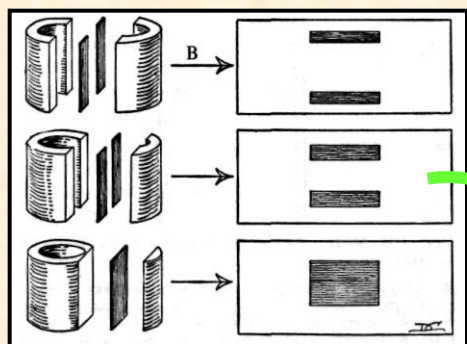
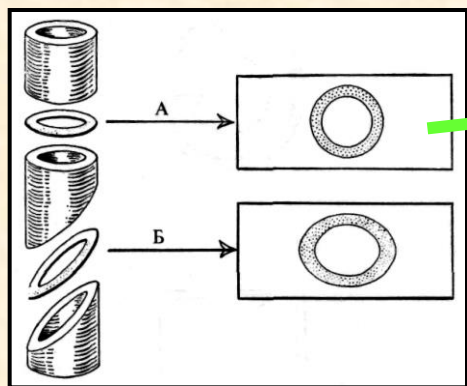
Б

Яичник. Увеличение x56.

Микрофотография демонстрирует различные участки фолликулов, попавших в срез:

А – вид в профиль; Б – вид сверху.

Интерпретация формы сечения объекта (пример 2)



Почка. Кортиковое вещество. Нефрон. Увеличение: x 280

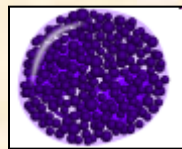
1. Почечное тельце
 2. Канальцевая система
- a.** продольные срезы
b. поперечные срезы

A – правильное поперечное сечение;

B – косое сечение

Интерпретация окрашивания клеток и тканей

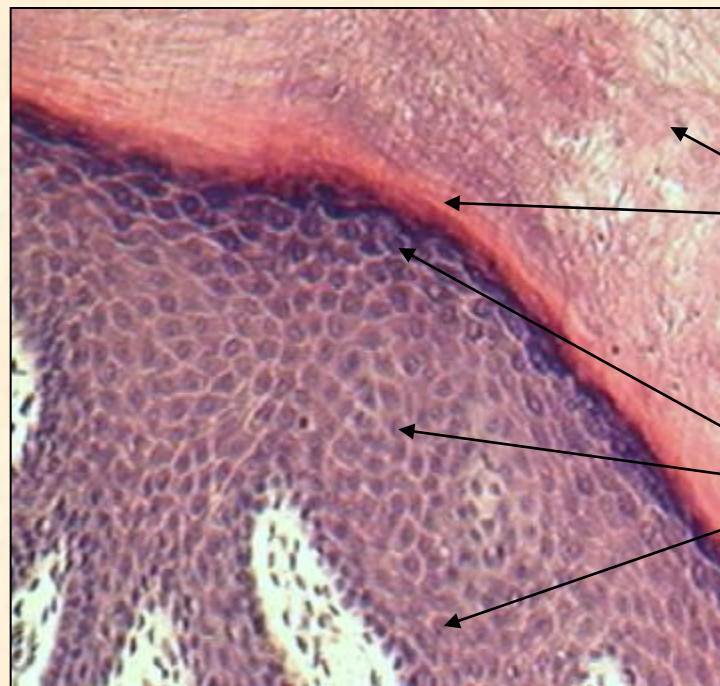
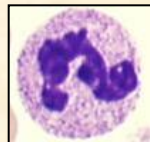
Метахромазия
зернистости
базофильного
гранулоцита



Оксифилия
зернистости
эозинофильного
гранулоцита



Нейтрофилия
зернистости
нейтрофильного
гранулоцита



Оксифилия
поверхностных
слоев

Базофилия
глубоких слоев

Зернистые лейкоциты.

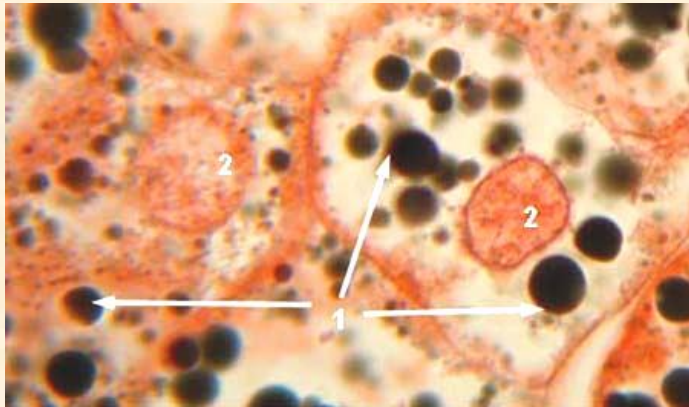
Окраска по Романовскому-Гимзе.
Увеличение: x630.

Многослойный плоский ороговевающий эпителий.

Окраска: гематоксилин-эозин.
Увеличение: x56.

Гистохимические методы

Клетки печени



Окраска осмиевая кислота и сафранин

1 - включения липидов;
2 – ядра

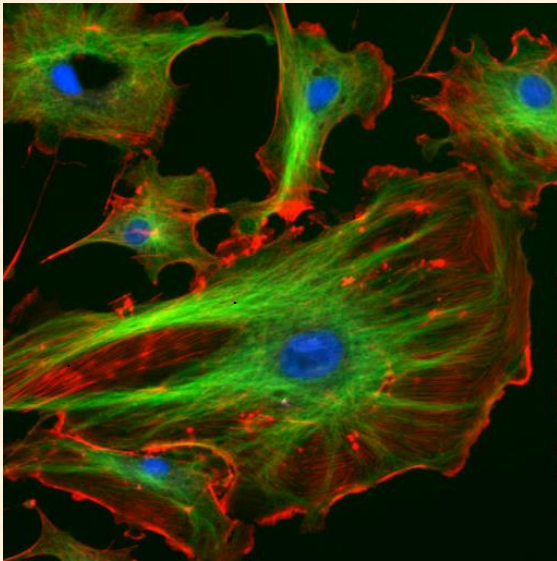
а



Окраска по Бесту

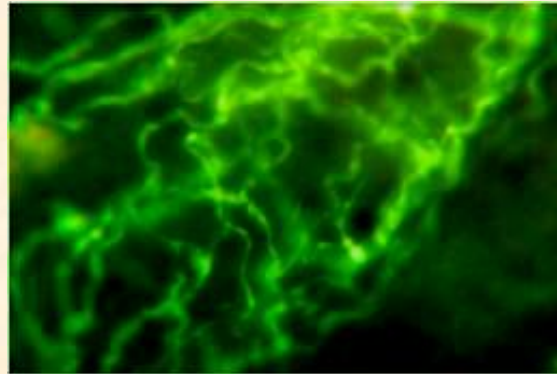
1 – включения гликогена;
2 – ядра

Гисто- и иммуноцитохимические методы (примеры)



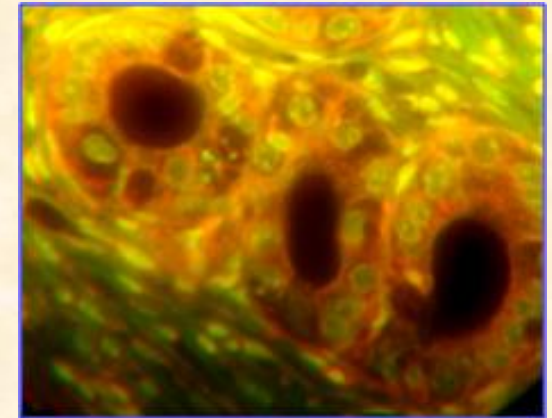
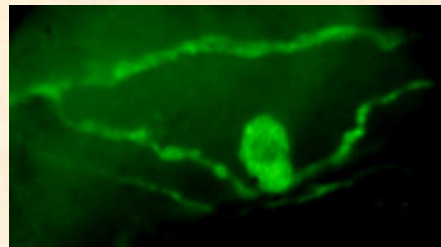
Цитоскелет эукариот
(эндотелиальные клетки быка)
Иммуноцитохимический метод
окрашивания

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.

Количественный анализ гистологических препаратов

Денситометрические методы

Основаны на избирательном поглощении различными веществами лучей со строго определенной длиной волны. Интенсивность поглощения света зависит от концентрации вещества (оптической плотности структуры).

Цитоспектро-
фотометрия

Цитоспектро-
флюориметрия

Морфометрические методы

Описывают метрические свойства морфологических структур в двух- и трехмерной системе, позволяют провести трехмерную реконструкцию объекта

Планиметрия
(на плоскости)

Стереометрия
(в объеме)

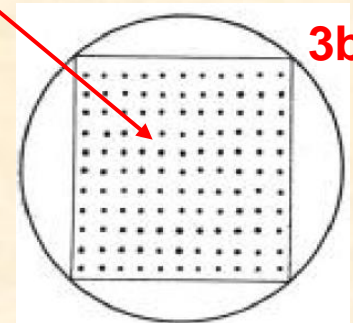
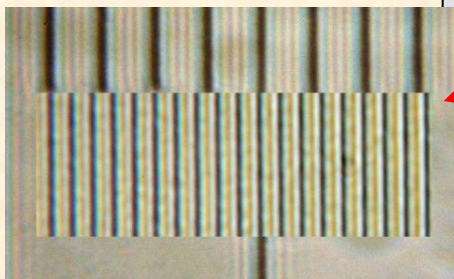
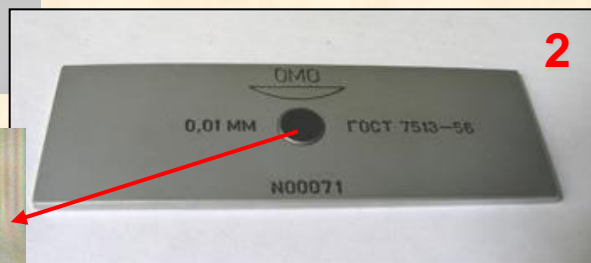
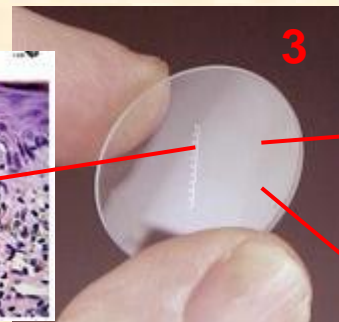
Статистические методы

Позволяют установить характер связи между различными признаками, сравнивать объекты одного и разных организмов и т.д.

Техническое оснащение морфометрических исследований

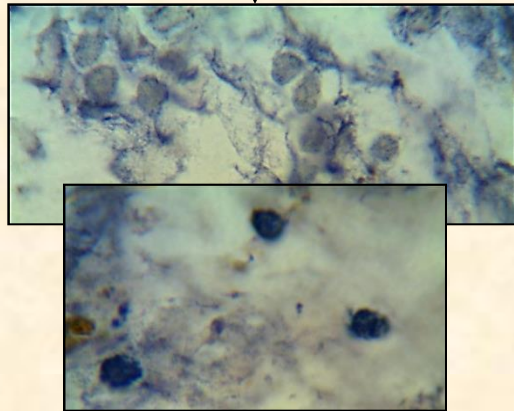
Количественный микроскопический анализ проводят на разных уровнях увеличения светового и электронного микроскопов.

В качестве технического оснащения могут быть использованы винтовой окуляр-микрометр (1) и объект-микрометр (2), окулярные вставки (3) для планиметрии и стереометрии, измерительные окулярные линейки (3a), квадратно-сетчатые окулярные вставки (3b).



Количественный анализ гистологических препаратов (примеры)

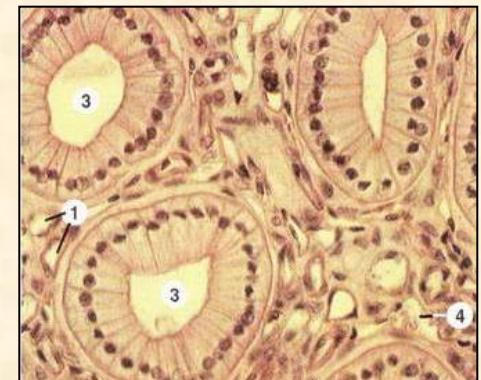
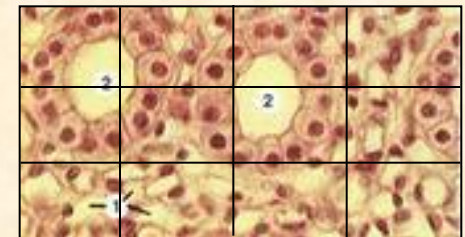
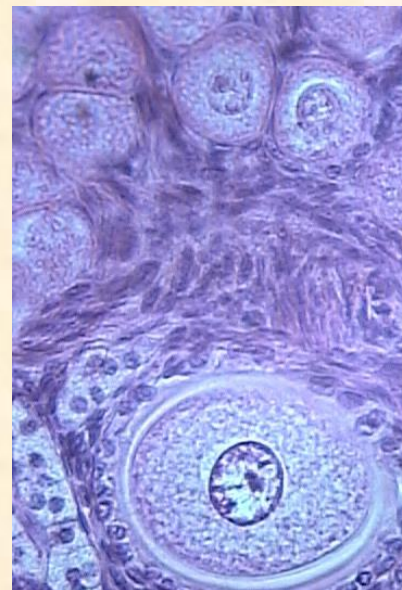
Денситометрические методы



Основаны на избирательном поглощении различными веществами лучей со строго определенной длиной волны. Интенсивность поглощения света зависит от концентрации вещества (оптической плотности структуры).

Морфометрические методы

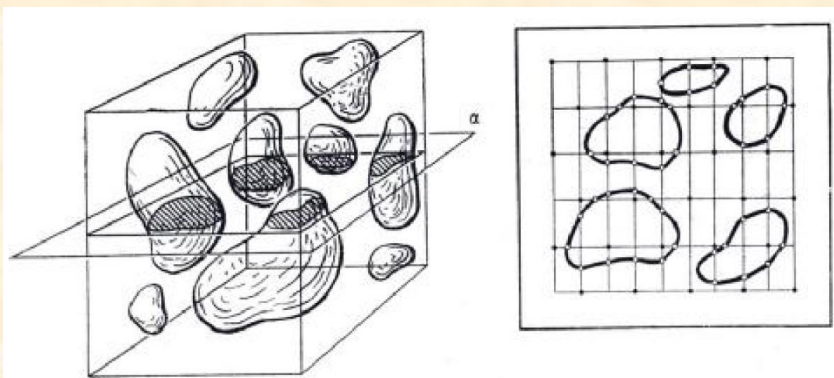
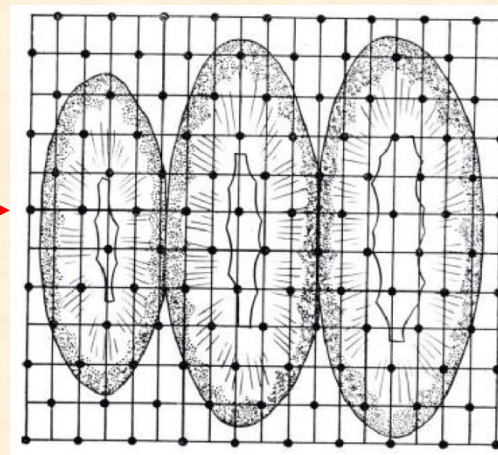
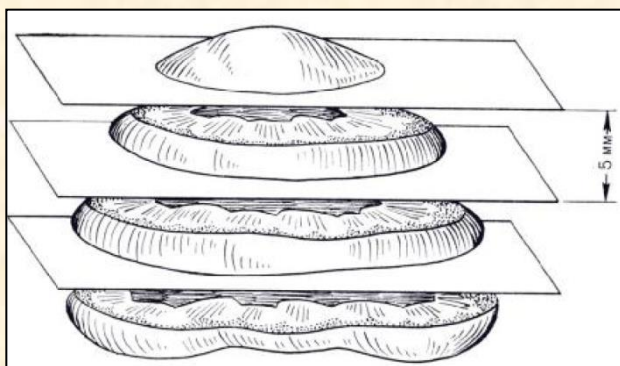
Планиметрия (на плоскости)



Количественный анализ гистологических препаратов

**Морфометрические
методы**

Стереометрия
(в объеме)
позволяют провести
трехмерную реконструкцию
объекта



Автоматизация морфометрических исследований

В настоящее время для морфометрических исследований широко используются комплексы автоматизированной микроскопии, объединяющие работу микроскопа, цифровой камеры и компьютерного программного обеспечения в одну общую и простую систему для съемки и анализа изображений.

Широта функций автоматических систем позволяет проводить статистическую обработку и анализ результатов измерений, а также моделирование различных процессов.



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.