

Тихоокеанский государственный медицинский университет

ГИСТОЛОГИЯ ЭМБРИОЛОГИЯ ЦИТОЛОГИЯ

Под редакцией

д.м.н., доцента Н.Ю. Матвеевой

Учебно-методическое пособие



Владивосток
Медицина ДВ
2015

УДК 611 (07)
ББК 28.703/706
Г516

*Издано по рекомендации редакционно-издательского совета
Тихоокеанского государственного медицинского университета*

Рецензенты:

С.С. Целуйко – д.м.н., профессор,
заведующий кафедрой гистологии и биологии
ГБОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

А.П. Анисимов – д.б.н., профессор,
заведующий кафедрой клеточной биологии и генетики
ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Авторы:

*Н.Ю. Матвеева, С.Г. Калининко, И.В. Ковалева,
С.С. Едранов, А.В. Коробцов, И.И. Вавилова*

Г516 **Гистология, эмбриология, цитология** : учебно-методическое пособие. – [Под ред. Н.Ю. Матвеевой]. – Владивосток, 2015. – 256 с.

Предлагаемое учебно-методическое пособие написано в соответствии с действующей программой и новейшими данными по гистологии, эмбриологии и цитологии для студентов 1-2 курсов медицинских вузов по специальностям: 060101 Лечебное дело, 060103 Педиатрия, 060105 Медико-профилактическое дело, 060201 Стоматология. Основная задача пособия – дать студентам в краткой форме необходимую информацию для успешной работы во время лабораторных занятий и при индивидуальной работе на кафедре с целью развития у них навыков самостоятельного изучения микроструктуры тканей и выявления их основных морфологических признаков.

УДК 611 (07)
ББК 28.703/706

© Коллектив авторов ТГМУ, 2015
© «Медицина ДВ», 2015

Организация работы студентов на кафедре

В качестве основных форм работы со студентами на кафедре используются лекции и лабораторные занятия. Изучение крупных разделов завершается итоговым семинаром, на котором преподаватель, применяя различные формы контроля (тесты, опрос-беседы, диагностику микропрепаратов и микрофотографий, решение ситуационных задач) устанавливает и оценивает степень усвоения знаний студентами, а в конце курса (3-й семестр) предлагается итоговое тестирование и экзамен. Лекции дают возможность студентам получить наиболее современные и систематизированные знания по основным разделам предмета.

Задачей практического занятия является изучение морфологической организации клеток, тканей, органов и умение связать их строение с выполняемыми функциями. Студент должен овладеть навыками самостоятельного «чтения» гистологических препаратов, научиться воспроизводить гистологическую структуру как в устной форме, так и в виде рисунков.

Правила работы студентов на практических занятиях

1. За 5-10 минут до начала занятий дежурный принимает учебную комнату и после предъявления студенческого билета получает у лаборанта учебные пособия для практической работы всей группы. Дежурный несет ответственность за сохранность учебных пособий, микроскопических препаратов, таблиц, микроскопов, а также за общий порядок в учебной комнате во время работы. По окончании практического занятия дежурный сдает учебную комнату и получает студенческий билет у лаборанта.

2. К началу занятий студенты должны быть готовы для его проведения: надеть халаты, убрать портфели на специально отведенное место, приготовить для работы альбомы и набор цветных карандашей и получить у дежурного учебные пособия. Каждому студенту предоставляется закрепленный за ним микроскоп и набор соответствующих препаратов.

3. На занятие студенты должны приходить с подготовленным теоретическим материалом. В начале занятия и в ходе любого его этапа подготовка контролируется преподавателем. В случае неудовлетворительной теоретической подготовки и отсутствия рисунков гистологических препаратов в альбоме данное занятие студенту не засчитывается.

4. Во время самостоятельной работы на практических занятиях требуется соблюдать дисциплину, поддерживать порядок, бережно обращаться с микроскопами, гистологическими препаратами, таблицами и другим кафедральным имуществом.

5. На стенде «Учебно-методические материалы кафедры» студенты должны ознакомиться с календарным расписанием и темами лекций, практических и итоговых занятий, контрольными вопросами для подготовки, с графиком сдачи отработок, а также объявлениями и другой необходимой информацией.

ВВЕДЕНИЕ В ДИСЦИПЛИНУ

1.1. Гистологическая техника

В настоящее время одним из наиболее современных видов микроскопической техники считается конфокальная микроскопия. Она широко используется в клеточной биологии и позволяет изучить структуры клеток и их органоидов благодаря своему высокому разрешению и контрасту, например, цитоскелет, ядро, хромосомы, или даже локализацию в них отдельных генов. Записав в памяти компьютера серию оптических срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов. Кроме того, конфокальная микроскопия позволяет исследовать динамические процессы, происходящие в живых клетках, например, движение ионов кальция и других веществ через клеточные мембраны.

Новыми перспективными направлениями являются методики FRAP (восстановление флуоресценции после фотовыжигания) и FRET (передача энергии посредством флуоресцентного резонанса). Данные методы применяются для исследования подвижности биоорганических молекул, а также для определения расстояния между молекулами разных типов, их окружения и взаимодействия.

Большинство современных конфокальных микроскопов построено на базе люминесцентного микроскопа. Следовательно, объекты исследования должны быть предварительно окрашены соответствующим люминесцентным красителем или обладать собственной флуоресценцией. Конфокальный микроскоп предназначен, прежде всего, для усиления контраста изображения; принцип его работы основан на использовании лазерного осветителя, высокочувствительного фотоприемника и компьютерной обработки изображения. Разрешающая способность конфокального микроскопа – его важнейший параметр. Это минимальное расстояние

между двумя точками, при котором прибор может различать их как отдельные структуры. Теоретически, разрешающая способность конфокального микроскопа в 1,4 раза выше обычного. Она зависит от длины волны излучения, поэтому существует предел, накладываемый волновыми свойствами света. Поскольку конфокальный микроскоп – прибор оптико-электронный, его разрешающая способность зависит не только от оптических узлов, но и от электронных систем преобразования оптического сигнала в электрический, а затем в цифровой. Конфокальный микроскоп позволяет рассмотреть структуры размером от 1-2 мкм до 0,2 мкм. Для изучения более мелких объектов придется применять другие методы, например, электронную микроскопию.

Поляризационная микроскопия помогает выявить структуры с упорядоченным расположением молекул (например, кристаллы или фибриллярные белки). Такие структуры обладают двойным лучепреломлением (анизотропией): проходящий через них световой луч разделяется на два, распространяющихся с различной скоростью и в различных направлениях. В поле зрения поляризационного микроскопа анизотропные объекты оказываются ярко светящимися на темном поле.

Интерференционная микроскопия тоже основана на применении поляризационного света. На основе эффекта фазового сдвига можно судить о структурах объекта и плотности отдельных участков: т.к. сдвиг связан с плотностью структуры, то, измерив величину клетки (или ее части), можно найти ее сухой вес в граммах.

Флуоресцентная микроскопия позволяет изучать как собственную (первичную) флуоресценцию ряда веществ, так и вторичную флуоресценцию, вызывая ее окрашиванием биологических структур специальными красителями – флуорохромами. Принцип метода состоит в том, что некоторые вещества при световом облучении сами начинают светиться, причем длина волны испускаемого ими света всегда больше, чем длина волны света, возбуждающего флуоресценцию. Поэтому, для возбуждения флуоресценции в видимой части спектра обычно пользуются синими или ультрафиолетовыми лучами. Собственной флуоресценцией обладают нуклеиновые кислоты, рибофлавин и ряд других веществ. В качестве флуорохрома чаще всего применяют акридиновый оранжевый. Флуоресценцию можно наблюдать визуально и фотографировать. Всеми необходимыми качествами для произведения флуоресцентной микроскопии обладает наш отечественный микроскоп МЛ-2.

Электронная микроскопия. Создание электронного микроскопа основано на возможности магнитного поля, обладающего магнитной симметрией подобно линзам, фокусировать поток электронов (Буш, 1926). В связи с тем, что длина волны электромагнитного колебания при движении электронов ($\lambda = 0,0056$) короче длины волны видимого света (200-800 нм), разрешающая сила электронного микроскопа во много раз больше, чем у световых микроскопов. Полностью реализовать возможности электронного луча невозможно в связи с техническими затруднениями, однако, уже сейчас разрешающая способность электронного микроскопа равна $1/2$ - $1/4$ нм. Отечественные электронные микроскопы ЭММА-10 К имеют разрешающую способность 0,5 нм, а ЭНМ-100 Л – 0,25 нм. Электронный микроскоп построен следующим образом: 1) источник электронов (по типу электронной пушки); 2) система электромагнитных конденсоров; 3) держатель образца (исследуемого объекта); 4) электронный объектив (система электромагнитов); 5) система электронных проекторов; 6) флуоресцентный экран для визуального наблюдения; 7) камера для фоторегистрации изображения. Вся система электронного микроскопа работает в глубоком вакууме. В отличие от светового микроскопа, в котором изображение определяется в связи с поглощением света, в электронном микроскопе флуоресценция экрана и воспроизведение деталей объекта зависят от степени рассеивания электронов при прохождении через изучаемый объект. Препараты для электронного микроскопа должны быть тонкими (0,5-2,0 нм). Готовятся они на специальном ультратоме.

В последние годы широко используются иммуноцитохимические и гистохимические методы исследования, целью которых является изучение химического состава тканей и клеток при сохранении их структуры, а также установление локализации химических веществ в определенных компонентах тканей, типах клеток и клеточных структурах. Имеющиеся в арсенале современной науки гистохимические реакции охватывают методы для выявления белков и аминокислот, нуклеиновых кислот, липидов, биогенных аминов, неорганических веществ, ферментов и т.д.

Мотивационная характеристика темы

Развитие гистологии как науки и ее дальнейший прогресс тесно связаны с совершенствованием методов исследования. Гистология располагает большим арсеналом средств для изучения биологических структур на всех уровнях их организации: клеточном, тканевом, ор-

ганном. Методы исследования, применяемые гистологией, необходимы врачу любого профиля для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, познания причин, вызывающих болезни и осложнения их течения. Материалы темы «Гистологическая техника» способствуют активному формированию мировоззрения будущего врача. Взаимоотношения между структурой и функцией рассматриваются с позиции диалектического представления о единстве материи и ее движения; нет структуры без функции и нет функции без структуры. Структура является материальным субстратом любой функции организма. Необходимо отметить, что прогресс современной гистологии в большей степени определяется тем, что она основывается на достижениях физики, химии, математики и информационных технологий. Внедрение новейших методов исследования обуславливает бурное развитие биологических наук, в том числе гистологии, обеспечивает широкое внедрение гистологии в клинические дисциплины.

Учебная цель

Общая цель. Знать общие принципы микроскопических методов исследования и общebiологические основы гистологии. Уметь работать на световом микроскопе. Уметь приготовить постоянный гистологический препарат.

Конкретная цель: знать принципы работы и овладеть навыками работы на световом микроскопе. Знать принципы работы поляризационной, фазово-контрастной, флуоресцентной, электронной микроскопии. Знать основные этапы приготовления постоянного гистологического препарата. Иметь представление о гистологических и гистохимических методах исследования. Иметь представление о количественном методе исследования.

Вопросы для самоподготовки

1. Назовите основные части светового микроскопа.
2. Правила работы с микроскопом.
3. Конфокальная микроскопия и ее применение при исследовании объектов.
4. Каковы возможности фазово-контрастной и интерференционной микроскопии в изучении биологических объектов?
5. Люминесцентная микроскопия. Первичная и вторичная флуоресценция.
6. Принципы работы электронного микроскопа. Его разрешающая способность.

Рекомендации для работы на занятии

Задание 1. Овладеть правилами работы со световым микроскопом.
Объект изучения: «Биолам», «Эрудит», «МБР-1». *Программа действий:* научиться микроскопировать при малом и большом увеличении объектива. *Ориентировочные основы действий:* прежде чем начать работу с микроскопом, нужно установить его на рабочем месте так, чтобы он был обращен колонкой к наблюдателю, а зеркалом – к источнику света. Затем установить освещение при слабом увеличении объектива, повернув зеркало так, чтобы поле зрения микроскопа было освещено равномерно и достаточно ярко, но свет не раздражал глаз. После этого положить препарат на предметный столик покровным стеклом кверху, чтобы объектив приходился против отверстия столика. Микроскопирование препарата всегда надо начинать при слабом увеличении, глядя сбоку на микроскоп, опустить его тубус, вращая от себя макровинт до тех пор, пока фронтальная линия объектива не будет на расстоянии 0,5 см от покровного стекла. Затем смотрят в окуляр левым глазом, и держа при этом правый глаз открытым, медленно вращают макровинт на себя до получения изображения препарата. Для более четкой наводки пользуются микровинтом, вращая его не более чем на пол-оборота в обоих направлениях. С помощью микровинта можно определить толщину препарата в мкм. Изучая препарат при слабом увеличении микроскопа, нельзя ограничиваться одним полем зрения – необходимо исследовать препарат по всей его поверхности, т.к. заключенный под покровное стекло гистологический срез может лежать не совсем горизонтально, и толщина его частей может быть разной. При его перемещении теряется четкость изображения. Поэтому нужно, передвигая препарат, держать свободную руку на макровинте и слегка вращать его. Но при этом необходимо помнить, что микроскоп дает обратное изображение, т.е. при перемещении препарата сверху вниз изображение будет двигаться снизу вверх.

После того, как на препарате найдено хорошее место дальнейшего изучения, следует поставить его в центре поля зрения и закрепить зажимами. После этого сменить увеличение на сильное: поднять тубус микроскопа при помощи поворота микровинта на себя, сменить объектив слабого на объектив сильного увеличения поворотом револьвера. Глядя сбоку на микроскоп, вращают микровинт от себя до тех пор, пока фронтальная линза не приблизится вплотную к покровному стеклу. После этого, глядя в окуляр, осторожно вращают микровинт на себя до появления четкого изображения препарата. Наиболее четкая наводка на фокус достигается вращением микровинта так же, как и при слабом увеличении. После окончания микроскопирования нельзя сразу сни-

мать препарат с предметного стекла, нужно предварительно поднять тубус несколькими оборотами макровинта, иначе можно повредить препаратом фронтальную линзу. Затем приводят микроскоп в исходное состояние, т.е. ставят над отверстием столика объектив слабого увеличения на расстоянии 2-3 см от него. Переносят микроскоп, держат правой рукой колонку штатива, а левую подставляют под его основание. С помощью оптических микроскопов можно изучать биологические объекты при различном увеличении. Увеличение до $\times 440$ дают «сухие» объекты, т.е. те, при работе с которыми между препаратом и объективом есть небольшое пространство (воздух). Большое увеличение достигается с помощью короткофокусных объективов, когда между объективом и исследуемым препаратом помещают каплю жидкости (вода, масло). Эта система называется иммерсионной. В зависимости от применяемой жидкости различают масляную или водную иммерсию. Иммерсионная система позволяет изучать препараты с увеличением в 1200-1500 раз. Оптические микроскопы обладают ограниченными данными, в связи с чем в гистологию введены новые методы микроскопии.

1.2. Приготовление постоянного гистологического препарата

Этапы приготовления постоянного гистологического препарата. Постоянный гистологический препарат – это изготовленный из тканей и органов объект, позволяющий узнать их структуру с помощью микроскопирования. Он может представлять собой тонкий срез органов, тотальный препарат (мягкая мозговая оболочка, рыхлая соединительная ткань), мазок (красный костный мозг, кровь и пунктат органа), отпечаток органов (печень, селезенка). Обработка объектов для приготовления из него постоянного гистологического препарата включает следующие моменты: 1) взятие материала, 2) фиксирование, 3) обезвоживание и уплотнение, 4) заливка в плотные среды, 5) изготовление срезов, 6) окрашивание, 7) просветление и заключение в среду, служащую для сохранения препаратов.

Взятие материала: объекты, подлежащие исследованию, фиксируются или замораживаются для сохранения структуры органов. В некоторых случаях пользуются иссечением тканей из живого организма (биопсия) с целью диагностического морфологического исследования. Иссечение кусочков проводится острым инструментом (бритвы, секционные ножи) во избежание повреждения тканей. Ножницами пользуются при иссечении оболочек (сальник, мягкая мозговая оболочка) и