



Некоммерческое образовательное учреждение Учебно-научно-производственный комплекс
«Международный университет Кыргызстана»

Система менеджмента качества
Инструкция по технике безопасности кафедры «Анатомии»
Международная школа медицины



«Утверждаю»

Ректор УНПК «МУК»

к.т.н., проф. Савченко Е.Ю.

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

по дисциплине “Гистология”

Бишкек- 2021

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГИСТОЛОГИИ. МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ И ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА

Гистология, цитология и эмбриология имеют собственные методы исследования, как классические, так и современные. Эти методы исследования используются не только для изучения строения и функций нормальных клеток, тканей и органов, но и находят все более широкое применение в клинической практике. Все они базируются на микроскопии гистологических объектов, обработанных специальными способами. Поэтому условно гистологические методы исследования можно разделить на микроскопические (микроскопическая техника), а также методы обработки гистологического материала и подготовки его к микроскопированию (гистологическая техника).

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА

Для гистологических исследований используется прибор МИКРОСКОП. В зависимости от используемого для просвечивания гистологического объекта физического явления различают две основные группы микроскопов: световые и электронные. В световых микроскопах для просвечивания объекта используется световой поток. Для электронной микроскопии в этих целях применяется пучок электронов.

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА

Гистологическая техника - это техника приготовления гистологического препарата. В роли гистологического препарата могут выступать срез органа, ткани, мазок, отпечаток, пленочный препарат, шлиф ткани (например, костной), культура ткани. Во всех случаях гистологический препарат должен отвечать таким требованиям:

1. Быть прозрачным, т.е. пропускать поток света. Для этого изготавливают достаточно тонкие срезы органов, тканей, клеток.
2. Быть контрастным, что достигается окрашиванием препарата.
3. Быть постоянным, т.е. сохраняться длительное время и служить в качестве своеобразного документа. Это требование обеспечивается фиксацией гистологического материала и заключением срезов в специальные консервирующие среды. Все эти требования к гистологическому препарату выполняются в процессе его изготовления в ходе гистологической техники.

Гистологическая техника включает в себя несколько этапов:

Взятие материала:

- ✓ во время операции;
- ✓ от трупов людей;
- ✓ от экспериментальных животных после их умерщвления;
- ✓ от живых людей и экспериментальных животных путем пункционной биопсии;
- ✓ взятие крови, красного костного мозга путем пункции;
- ✓ приготовление отпечатков (с полости рта, влагалища и т.д.).

Фиксация материала:

- ✓ фиксация полученного гистологического материала - воздействие на него химическими веществами, а также физическими факторами, что препятствует дальнейшему разрушению тканей объекта и сохраняет его структуру.

Физические фиксирующие факторы - замораживание (твердой углекислотой, в жидком азоте, кислороде и т.д.), воздействие высокой температуры, рентгеновское облучение. Все эти факторы вызывают гибель микроорганизмов и инактивируют собственные ферменты

тканей, способствуя сохранению гистологического материала. Химические фиксаторы также вызывают гибель микробов и собственных ферментов тканей, стабилизируют структуру объекта. Полагают, что при химической фиксации (например, альдегидами) образуются поперечные сшивки в молекулах белка, превращающие их в устойчивые к различным воздействиям структуры. Различают простые и сложные химические фиксаторы. Простые фиксаторы состоят из одного химического вещества (такowymi являются, например, формалин, спирт, уксусная кислота и др.). Эти фиксаторы, однако, приводят к определенным нарушениям структуры гистологического материала. Так, формалин вызывает его сморщивание, уменьшение в размерах. Уксусная кислота, наоборот, вызывает набухание объекта. Поэтому чаще применяют сложные фиксаторы, в которых отрицательное действие простых фиксаторов нивелируется. Например, фиксатор ФСУ состоит из 4 частей формалина, 1 части спирта и 0.3 части уксусной кислоты. Этот фиксатор вызывает весьма незначительные изменения структуры объекта и используется в тонких, особенно морфометрических, исследованиях. Известно множество и других сложных фиксаторов.

3. Промывка

Для вымывания фиксатора из тканей используют воду или другие вещества (спирт). Время промывания должно быть достаточным для того, чтобы полностью удалить фиксатор из гистологического объекта.

4. Обезвоживание

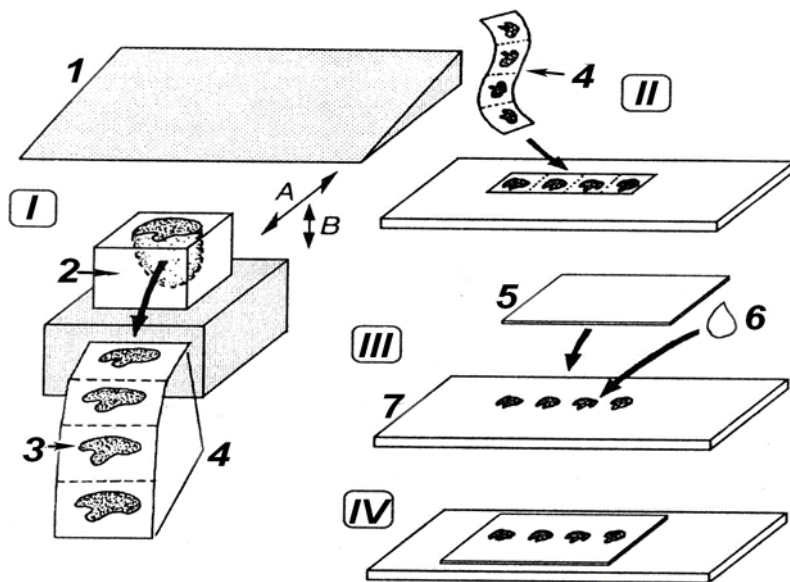
В ходе этой процедуры из объекта удаляют воду путем помещения его в спирты возрастающей концентрации, а затем в хлороформ.

5. Уплотнение материала

Проводится для того, чтобы из объекта можно было приготовить тонкие срезы. Оно осуществляется путем заливки материала в парафин, целлоидин, целлоидин-парафин или другие уплотняющие среды. Можно уплотнить материал и путем замораживания в жидком азоте, углекислоте, что используется в гистохимии ферментов, липидов. При этом сохраняются интактными все ферменты и липиды.

6. Изготовление срезов

Этот этап выполняется при помощи приборов микротомов. В них используются острые ножи. Существуют две конструкции микротомов. В одной из них ножи закрепляются неподвижно. Объект, залитый в парафин (гистологический блок), движется вперед в течение каждого цикла (оборота приводного колеса) на определенное расстояние (3-10 мкм), и с его поверхности срезаются срезы такой же толщины. Это так называемые ротационные микротомы. В микротомов других конструкций (санные микротомы) неподвижно закрепляется гистологический объект, который поднимается вверх при каждом цикле, а нож в специальном держателе передвигается лаборантом вперед-назад в горизонтальной плоскости.



Приготовление постоянного гистологического препарата из гистологического материала, залитого в затвердевающую среду (по В.Л. Быкову)

I изготовление срезов на микротоме; II – монтирование срезов на предметное стекло и окрашивание; III – заключение срезов в прозрачную консервирующую среду; IV – готовый гистологический препарат.

1 - микротомный нож; 2 – блок; 3 – срез; 4 – серия срезов; 5 – покровное стекло; 6 – консервирующая среда; 7 – предметное стекло.

7. Удаление из срезов парафина

Срезы помещаются на предметное стекло, подсушиваются и помещаются на определенное время в растворители парафина - ксилол, толуол, бензол или в другие вещества.

8. Окрашивание срезов

При помощи окрашивания достигается контрастность препаратов. Для этого используют различные красители. В зависимости от источника получения они подразделяются на красители животного, растительного происхождения и синтетические. Кроме того, все красители делятся на кислые (образованы кислотами), основные (образованы основаниями) и нейтральные. Примером кислого красителя может служить эозин, являющийся синтетическим красителем. Пример основного красителя - гематоксилин. Он получается из коры некоторых пород деревьев (кампешевое дерево).

9. Обезвоживание и просветление срезов. Осуществляется последовательно в батареях спирта и ксилола

В зависимости от окрашивающейся части клетки красители делятся на цитоплазматические (окрашивают цитоплазму клетки, например, эозин) и ядерные (окрашивают ядро, например, гематоксилин, азур и др.).

ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТКАНЕЙ

Под тинкториальными свойствами понимают способность тканей и клеток окрашиваться красителями. Для обозначения тинкториальных свойств используют такие термины.

1. **ОКСИФИЛИЯ (АЦИДОФИЛИЯ)** - это способность клеток и тканей окрашиваться кислыми красителями. Сами структуры при этом имеют основные свойства. Например, эритроциты обладают оксифилией за счет содержания в них основного белка гемоглобина.

2. **ЭОЗИНОФИЛИЯ** (вариант оксифилии) - способность структур окрашиваться кислым красителем эозином. Эозинофилией обладает цитоплазма многих клеток.

3. **БАЗОФИЛИЯ** - способность структур окрашиваться основными красителями. При этом сами структуры должны иметь кислую реакцию. Например, нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) обладают базофилией, т.к. по химическим законам могут связывать красители-основания. Благодаря этому ядро любой клетки в той или иной степени базофильно. Базофилией обладает также цитоплазма белоксинтезирующих клеток из-за содержащейся в многочисленных рибосомах РНК.

4. **ПОЛИХРОМАТОФИЛИЯ** - способность структур клетки окрашиваться и кислыми, и основными красителями. Таким качеством обладают, например, гранулы нейтрофильных лейкоцитов. Иногда в качестве синонима используют термин **НЕЙТРОФИЛИЯ**.

5. **МЕТАХРОМАЗИЯ** - способность гистологических структур при связывании красителя изменять его цвет. В результате структуры окрашиваются в цвет, который отличается от цвета красителя в растворе. Чаще всего метакромазией обладают углеводные соединения, и появление метакромазии говорит о присутствии в клетке или ткани сложных углеводов.

6. **АРГЕНТОФИЛИЯ** - способность структур окрашиваться солями серебра.

7. **ХРОМОФИЛИЯ** - способность структур окрашиваться солями хрома.

10. Заключение, или консервация срезов

На срез наносят каплю синтетической среды или канадского бальзама, а затем покрывают покровным стеклом. После высыхания бальзама препарат прозрачен, может быть подвергнут изучению под микроскопом, способен долго храниться и может использоваться как своеобразный документ.

Следует подчеркнуть, что для изготовления гистопрепаратов используются предметные стекла, тщательно вымытые и обработанные в специальных средах.

Инструкция составлена:

Заведующий кафедрой «Анатомии»



Акматов Н.А.