



Министерство сельского хозяйства
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Самарская государственная
сельскохозяйственная академия»

Кафедра «Анатомия, акушерство и хирургия»

Д. Ю. Гришина, Л. А. Минюк

Цитология, гистология, эмбриология

Часть 1

**Методические указания
и рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий**

Кинель
РИЦ СГСХА
2014

УДК 591.81(07)
ББК 45.25.Р
Г-85

Гришина, Д. Ю.

Г-85 Цитология, гистология, эмбриология : методические указания и рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий / Д. Ю. Гришина, Л. А. Минюк. – Кинель : РИЦ СГСХА, 2014. – Ч. 1. – 121 с.

В методических указаниях представлены сведения о методах гистологического исследования, особенности строения клеток животного происхождения. Рассмотрены способы деления клеток, нарушения их нормального деления, этапы развития многоклеточных организмов в эмбриогенезе, особенности строения различных типов тканей.

Для проверки степени усвоения заданий составлены контрольные вопросы. Кроме того в конце каждого раздела представлены вопросы к коллоквиуму.

Издание предназначено для студентов очного и заочного отделения факультета биотехнологии и ветеринарной медицины, обучающихся по специальности 111801.65 «Ветеринария».

© ФГБОУ ВПО Самарская ГСХА, 2014
© Гришина Д. Ю., Минюк Л. А., 2014

Предисловие

При подготовке ветеринарных врачей среди общих биологических дисциплин важное место занимают цитология, гистология, эмбриология.

Предметом гистологических исследований являются разновидности клеток и тканей: клетки про- и эукариот, клетки животных одноклеточных и многоклеточных организмов, а в пределах последних – клетки различных направлений, специализаций.

Подготовка специалистов на современном уровне, обладающих основательными теоретическими знаниями и практическими навыками не возможна без совершенствования самостоятельной работы студентов. Цель методических указаний научить студентов самостоятельно работать с учебниками, атласами, гистологическими препаратами, слайдами. Для проверки уровня знаний студентов к каждому разделу составлены контрольные вопросы. Дисциплина "Цитология, гистология и эмбриология" является одной из трудноусваиваемых, поэтому для выполнения предлагаемых заданий даются краткие сведения справочного характера.

Приобретенные навыки в процессе самостоятельной работы необходимы для формирования врачебного мышления, а также для экспериментальной и научно-исследовательской работы студентов.

Приступая к практическим занятиям или самостоятельной работе, студент обязан ознакомиться с инструкцией по технике безопасности и правилами работы в гистологической лаборатории.

ЗАНЯТИЕ 1. МЕТОДЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель: ознакомиться с основными методами приготовления гистологических препаратов, изучения их под микроскопом.

Задачи: 1. изучить технику приготовления гистологического препарата; 2. ознакомиться с основными этапами приготовления постоянного гистологического препарата; ознакомиться с основными красителями срезов и освоить метод окраски их гематоксилин-эозином; изучить устройство микроскопа и правила работы с ним.

Материалы и оборудование: санный микротом; микроскоп; практикум по цитологии, эмбриологии и гистологии [11] и атласы микроскопического и ультрамикроскопического строения клеток, тканей, органов [2, 3].

Задача 1. Изучить технику приготовления гистологического препарата [1, с. 16].

Цель приготовления гистологического препарата заключается в том, чтобы сохранить объект исследования от разложения (гниения), сделать его удобным (контрастным, прозрачным) для изучения под микроскопом. Основным требованием является соблюдение чистоты при обработке объекта и последовательности ее этапов. В зависимости от методики приготовления выделяют временные (свежие) и постоянные гистологические препараты. Временные готовят из прозрачных объектов, например соскоб с внутренней поверхности слизистой оболочки щеки, мазок крови и т.д. Объект для исследования помещают на предметное стекло, на которое нанесена капля воды, физиологического раствора или глицерина, накрывают покровным стеклом и наблюдают под микроскопом. Для получения контрастного объекта иногда прибегают к слабому окрашиванию, используя безвредные (инертные) красители: отвары ягод черники, смородины, корнеплода свеклы, чешуи лука или чернила, растворы йода, метиленового синего и т. д. Временные гистологические препараты просты в изготовлении, но не пригодны для тщательного изучения объекта, так как они быстро высыхают, неконтрастны, не имеют специфической окраски органоидов клетки. Временные препараты чаще всего используются как предварительные, или рекогносцировочные.

Задача 2. Ознакомиться с основными этапами приготовления постоянного гистологического препарата.

Основные этапы изготовления препарата по схеме Ю. Т. Техвера.

1. Взятие материала. Материал (кусочки органов) для приготовления гистологического препарата берется от забитых животных, мертвых (не позднее 0,5 ч после смерти) или от живых животных путем биопсии. Площадь кусочков органа должна быть не более 1 см.

2. Фиксация материала. После взятия материал помещают в фиксирующую жидкость или микротомизируют в криостате. Основное назначение фиксаторов – предупредить (не допустить) гнилостные процессы в объекте исследования, уплотнить ткань и перевести химические компоненты клеток в нерастворимое состояние. Применяются простые и сложные фиксаторы. К простым относятся формалин различной концентрации, спирт (метиловый, этиловый), ацетон и т. д. Сложные фиксаторы – это многокомпонентные жидкости, которые готовятся по особым рецептам. Например, жидкость Буэна содержит: насыщенный раствор пикриновой кислоты – 75 мл, формалин – 25 мл, ледяную уксусную кислоту – 5 мл. Она применяется для фиксации органов и тканей эмбриона. Длительность фиксации – не более 24 ч. Жидкость Карнуа используется для фиксации материала, который исследуется гистохимическими реакциями на содержание нуклеиновых кислот. Она содержит: абсолютный спирт – 6 частей, ледяную уксусную кислоту – 1 часть, хлороформ 3 части. Фиксация продолжается 1 – 2 ч. Фиксация материала проводится обычно при комнатной температуре. Нагревание фиксатора ускоряет процесс фиксации, а охлаждение замедляет. При фиксации необходимо соблюдать следующие правила:

- 1) объем фиксирующей жидкости должен быть в 20-30 раз больше объема исследуемого объекта;
- 2) объект должен быть полностью погружен в фиксатор;
- 3) в фиксаторе не должно быть хлопьев;
- 4) фиксатор можно использовать только один раз. Длительное нахождение в фиксирующей жидкости искажает структуру объекта, затрудняет приготовление гистологического препарата.

3. Обезвоживание и уплотнение материала. Для получения тонких срезов необходимо уплотнение материала. Чем он плотнее, тем тоньше срез. Уплотнение материала проводят путем замораживания и заливки в целлоидин, парафин, смолы

и т.д. После фиксации материала в формалине его тщательно промывают водой (не менее 24 ч). Кусочки, залитые в целлоидин и парафин, обезвоживают путем проводки через спирты восходящей крепости (50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°). В каждом спирте материал находится 24 ч. Если спирт помутнеет, его заменяют новым. Объем спирта должен превышать объем материала в 100 раз.

Заливка в парафин проводится в несколько этапов. Обезвоженный материал последовательно помещают: а) в смесь абсолютного спирта (100°) и ксилола или абсолютного спирта и хлороформа (равные объемы) на 2-3 ч; б) в две порции чистого ксилола или хлороформа – на 2 ч в каждую; в) в насыщенный раствор парафина в ксилоле или хлороформе при температуре 37°С на 3 ч; г) в термостат в расплавленный парафин (две порции) при температуре 56°С. Время нахождения в каждой порции 1,5-2 ч. Из второй порции материал помещают в формочки для образования блоков и заливают его свежим расплавленным парафином при температуре 58°С. Затем формочки вынимают из термостата. Парафиновые блоки с залитым материалом затвердевают при комнатной температуре. Потом их подравнивают скальпелем, наклеивают этикетки и помещают на хранение в бумажные пакеты. С парафиновых блоков готовят срезы толщиной 3-5 мкм.

Заливка в целлоидин также проводится в несколько этапов. Обезвоженный материал последовательно помещают:

- а) в смесь абсолютного спирта с эфиром (равных объемов) на 24 ч;
- б) в 2% раствор целлоидина с абсолютным спиртом и эфиром на 2-7 сут;
- в) в 4%, 8%, 12% растворы целлоидина с абсолютным спиртом и эфиром. Время нахождения в каждом растворе – 2-4 сут;

г) в свежий 12% раствор целлоидина, налитый в открытую чашку Петри (для получения достаточной плотности). Через 2-3 дня спирт и эфир испарятся, а целлоидин уплотнится. Из него вырезают блоки с материалом и хранят в 70° этиловом спирте. С целлоидиновых блоков готовят срезы толщиной до 7-12 мкм.

4. Получение срезов. Срезы готовят с помощью специальных приборов – микротомов. Существуют:

- а) замораживающие микротомы (для получения срезов с замороженных кусочков), б) санные, или салазочные; в) вертикальные, или качающиеся (для получения срезов с кусочков, залитых в парафин); г) ультрамикротомы (для получения тонких

срезов при электронной микроскопии).

5. Окрашивание срезов. Гистологических красителей очень много. Выбирают их в зависимости:

а) от цели исследования объекта, б) от способа фиксирования.

Существует большое количество способов окраски срезов. Условно выделяют основные (гематоксилин, кармин и т. д.) и кислые (эозин, фуксин, эритрозин и т. д.) красители. Основные окрашивают ядро, кислые – цитоплазму.

6. Заключение срезов. Окрашенный, обезвоженный и просветленный срез переносят на предметное стекло, расправляют и заключают в бальзам. Ребром покровного стекла осторожно прикасаются к капле бальзама. Когда она растечется по ребру покровного стекла, поддерживаемого препаровальной иглой, стекло медленно опускают на срез. После просушивания (3-4 сут) на срез наклеивают этикетку с названием объекта исследования, методов фиксации и окраски.

Задача 3. Ознакомиться с основными красителями срезов и освоить метод окраски их гематоксилин-эозином.

Для изучения и хранения срезы окрашивают. Наиболее распространенной окраской гистологических препаратов является окраска гематоксилин-эозином.

Схема окраски срезов гематоксилин-эозином

1. Депарафинирование (срез помещают в ксилол или толуол на 5-10 мин).
2. Постепенное введение воды в ткань среза. Проводка через спиртовую «батарею» нисходящей крепости (100°, 96°, 90°, 80°, 70°, 60°, 50°). Продолжительность нахождения в каждом спирте – 1-2 мин.
3. Промывка в дистиллированной воде – не менее 1-2 мин (до 10-20 мин).
4. Окраска раствором гематоксилина – от 2 до 5 мин.
5. Промывка в водопроводной воде – 3 мин.
6. Окраска раствором эозина – от 1 до 2 мин.
7. Отмывка в дистиллированной воде – до 1 мин (очень быстро).
8. Обезвоживание в спиртах восходящей крепости (70°, 80°, 96°, 100°) по 1-2 мин в каждом.
9. Просветление (срез помещают в ксилол или толуол на 1-2 мин).
10. Заключение. На срез наносится капля бальзама. После наложения покровного стекла остатки бальзама удаляются чистой тряпочкой. Продолжительность сушки

окрашенного среза – 2-3 сут. Только после сушки препарат можно изучать с помощью микроскопа.

Результат окраски. Ядра окрашиваются в синий или черный цвет (в зависимости от метода приготовления раствора гематоксилина), цитоплазма – в розовый.

Задача 4. Познакомиться с микроскопом и правилами работы с ним.

На лабораторных занятиях студенты приобретают необходимые в практической работе навыки общения с гистологическим материалом, знакомятся с микроструктурой клетки, тканей и органов. К каждому занятию необходимо должен подготовиться: просмотреть учебник и конспект лекций с тем, чтобы иметь запас знаний, достаточный для выполнения задания. Для гистологических исследований необходимо уметь работать с микроскопом.

Правила работы с микроскопом

1. Поставить микроскоп на стол против левого плеча. Альбом положить справа от микроскопа.

2. Револьвер с объективом 8 (малое увеличение) установить в рабочее положение на высоте около 1 см от предметного столика.

3. С помощью вогнутого зеркала добиться равномерного и яркого освещения всего поля зрения. В окуляр микроскопа смотреть левым глазом, не закрывая правый.

4. С помощью макрометрического винта добиться четкого изображения.

5. При перемещении препарата на предметном столике придерживать его большим и указательным пальцами левой руки, правой вращать винты предметного столика. При этом помнить, что микроскоп дает обратное изображение объекта, т. е. перемещение препарата сверху вниз или справа налево при наблюдении под микроскопом соответствует перемещению снизу вверх или слева направо.

6. После тщательного изучения препарата (топографии его частей, их величины, окраски, формы и т. д.) с помощью объектива 8 выбрать место для исследования с помощью объектива 40 (большое увеличение), установив его строго в центр поля зрения.

7. Перевести микроскоп в новый режим работы: макрометрическим винтом приподнять тубус на пол-оборота (**на себя**) и установить револьвер с объективом 40 в рабочее положение.