

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Н.Д. ОВЧАРЕНКО, Е.Д. САФРОНОВА

**ОБЩАЯ ГИСТОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ
МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ**

Учебное пособие

Барнаул
Издательство АГАУ
2011

УДК 615. 471: 616-076

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии и физиологии Алтайского государственного университета О.В. Филатова;
кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии и гистологии ИВМ Алтайского государственного аграрного университета С.П. Ермакова.

Овчаренко Н.Д. Общая гистология с основами микроскопической техники: учебное пособие / Н.Д. Овчаренко, Е.Д. Сафронова. – Барнаул: Изд-во АГАУ, 2011. – 77 с.

ISBN 978-5-94485-186-4

Учебное издание включает два раздела «Общая гистология» и «Основы микроскопической техники».

Первый раздел содержит теоретические сведения о микроструктуре клеток и тканей, которые изложены на основе современных научных данных. Для более доступного изучения материала в пособии имеются рисунки гистологических препаратов, отражающие основные разделы курса.

Второй раздел посвящён гистологическим методам исследования. Основой гистологических методов является гистологическая техника – комплекс методических приёмов (взятие и подготовка материала для исследований, изготовление и окраска гистопрепаратов для микроскопических исследований).

Предназначено для повышения общепрофессиональных знаний студентов, магистрантов, аспирантов биологических направлений и специальностей, а также работников клинических и производственных лабораторий.

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета биолого-технологического менеджмента АГАУ (протокол № 5 от 19.11.2010 г.).

ISBN 978-5-94485-186-4

© Овчаренко Н.Д., Сафронова Е.Д., 2011

© ФГОУ ВПО АГАУ, 2011

© Издательство АГАУ, 2011

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЩАЯ ГИСТОЛОГИЯ	6
1.1. Общие принципы организации и классификация тканей б	
1.2. Эпителиальные ткани	7
1.2.1. <i>Покровный эпителий</i>	8
1.2.2. <i>Железистый эпителий</i>	13
1.3. Опорно-трофические (соединительные) ткани	16
1.3.1. <i>Кровь и лимфа</i>	17
1.3.2. <i>Рыхлая волокнистая соединительная ткань</i>	22
1.3.3. <i>Плотные волокнистые соединительные ткани</i>	24
1.3.4. <i>Жировая ткань</i>	26
1.3.5. <i>Ретикулярная ткань</i>	26
1.3.6. <i>Хрящевая ткань</i>	27
1.3.7. <i>Костная ткань</i>	30
1.4. Мышечные ткани	34
1.4.1. <i>Гладкая мышечная ткань</i>	34
1.4.2. <i>Скелетная (соматическая) мышечная ткань</i>	36
1.4.3. <i>Сердечная мышечная ткань</i>	40
1.5. Нервная ткань	42
2. ОСНОВЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ	51
2.1. Взятие и фиксация материала	51
2.1.1. <i>Техника вырезки материала</i>	51
2.1.2. <i>Общие принципы фиксации</i>	52
2.1.3. <i>Фиксирующие жидкости</i>	52
2.1.4. <i>Правила работы с фиксаторами</i>	54
2.2. Обезвоживание и заливка материала	54
2.2.1. <i>Способы обезвоживания тканей</i>	53
2.2.2. <i>Заливочные среды</i>	55
2.2.3. <i>Заливка ткани в парафин</i>	55
2.2.4. <i>Заливка ткани в целлоидин-парафин</i>	57
2.2.5. <i>Заливка ткани в желатин</i>	58

2.3. Приготовление гистологических срезов	59
2.3.1. <i>Микротомы и особенности работы на них</i>	59
2.3.2. <i>Особенности работы на санном микротоме</i>	60
2.3.3. <i>Особенности работы на ротационном микротоме</i>	61
2.3.4. <i>Особенности работы на замораживающем микротоме</i>	63
2.3.5. <i>Подготовка предметных стекол</i>	64
2.4. Общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов	65
2.4.1. <i>Подготовка срезов к окрашиванию</i>	66
2.4.2. <i>Ядерные красители и их приготовление</i>	67
2.4.3. <i>Цитоплазматические красители</i>	72
2.4.4. <i>Замечания по технике окрашивания</i>	72
2.4.5. <i>Просветление и заключение срезов</i>	73
2.5. Обзорные методы окраски тканей	74
2.5.1. <i>Общая схема окраски гематоксилином и эозином</i>	74
2.5.2. <i>Окрашивание соединительной и мышечной тканей</i>	75
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	77

ВВЕДЕНИЕ

Гистология, как известно, является наукой о развитии, строении и жизнедеятельности тканей животных организмов и человека. Она делится на три основные раздела: цитологию (учение о клетке), общую гистологию (учение о тканях) и частную гистологию (учение о микроскопическом строении органов).

В разделе «Общая гистология» изучаются функции и структуры отдельных тканей и их составных частей. Гистология теснейшим образом связана с такими биологическими, медицинскими и сельскохозяйственными дисциплинами, как морфология, физиология, а также является базисом для патологической анатомии и патологической физиологии.

Студенты старших курсов, магистранты и аспиранты, вовлекаясь в исследовательскую работу по морфологии, требующей знания микроскопической техники (взятие и подготовка материала к исследованию, изготовление и окраска гистопрепаратов), должны иметь чёткое представление о строении основных тканей.

Авторы, используя последние современные данные по общей гистологии и собрав ограниченные по количеству и малодоступные руководства по микроскопической технике, составили данное руководство в помощь начинающим исследователям в области морфологии.

1. ОБЩАЯ ГИСТОЛОГИЯ

1.1. Общие принципы организации и классификация тканей

Ткань – система клеток и их производных, специализированных на выполнении определенных функций.

Структурно-функциональными элементами тканей являются:

1. Клетка – главный элемент всех тканей, определяющий их основные свойства и дающий начало ряду производных.

2. Межклеточное вещество – совокупный продукт деятельности клеток данной ткани (в некоторых случаях, как, например, в крови, клеток других тканей). Содержание, состав и физико-химические свойства межклеточного вещества относительно постоянны и характерны для данной ткани. Межклеточное вещество в некоторых случаях может играть функционально ведущую роль (например, обеспечивать механическую прочность хрящевых и костных тканей). При гибели клеток межклеточное вещество неизбежно разрушается.

3. Постклеточные структуры – производные клеток, которые в ходе дифференцировки (чаще вследствие потери ядра и части органелл) утратили важнейшие признаки, характерные для клеток, но приобрели ряд свойств, необходимых для выполнения ими специализированных функций (эритроциты и тромбоциты крови, чешуйки эпидермиса, волос, ногтей).

4. Симпласты – крупные многоядерные образования. Симпласты (от греч. *syn* – вместе, *plastos* – образованный) – структуры, образованные в результате слияния клеток, с утратой их границ и формирование единой цитоплазматической массы, в которой находятся ядра. К симпластам относят: волокна скелетной мышечной ткани, наружный слой трофобласта, остеокласты.

5. Синцитий (греч. *syn* – вместе, *sytos* – клетка) – сетевидная структура, возникающая вследствие неполной цитотомии при делении клеток с сохранением связи между ее элементами посредством цитоплазматических мостиков. Ранее синцитиальное строение приписывали ряду различных тканей (ретикулярной, эпителиям, образующим основу тимуса и пульпы эмалиевого органа), однако по данным электронно-микроскопических исследований обнаружилось, что они построены из отдельных клеток звездчатой формы. Истинный синцитий – часть сперматогенных элементов в семенных канальцах семенников.

Системный принцип организации тканей проявляется в том, что каждая ткань представляет собой систему (не просто сумму) клеток и их производных и характеризуется рядом свойств, которые отсутствуют в отдельных клетках. Вместе с тем сами ткани в качестве элементов входят в системы более высокого уровня – органы, обладающие признаками, которыми не располагают отдельные ткани.

Ткани возникли в ходе эволюции на определенных этапах филогенеза. В процессе онтогенеза их источниками служат различные эмбриональные зачатки.

Развитие каждого вида тканей (гистогенез) обусловлено процессами детерминации и дифференцировки их клеток.

Детерминация тканей (от лат. *determinatio* – определение) происходит в ходе их развития из эмбриональных зачатков и является процессом, закрепляющим («программирующим») свойственное каждой ткани направление этого развития.

На молекулярно-биологическом уровне этот процесс осуществляется путем набора тех или иных генов, обуславливающих специфичность ткани.

Дифференцировка – процесс, в ходе которого клетки данной ткани реализуют закрепленные детерминацией возможности. При этом они проходят ряд стадий развития, постепенно приобретая структурные и функциональные свойства зрелых элементов. Дифференцировка клеток происходит как в развивающихся, так и зрелых тканях.

На основе общих морфологических, физиологических и генетических признаков принята классификация тканей, в соответствии с которой различают четыре типа тканей: эпителиальные, соединительные, или опорно-трофические, мышечные ткани, нервная ткань.

1.2. Эпителиальные ткани

Эпителиальные – пограничные ткани, которые располагаются на границе с внешней средой, покрывают поверхность тела, выстилают его полости, слизистые оболочки внутренних органов и образуют большинство желез.

Эпителиальные ткани развиваются из всех трех зародышевых листков эктодермы, энтодермы, мезодермы.

Функции эпителиев разнообразные: разграничительная, барьерная, защитная, трофическая, транспортная, секреторная, экскреторная, выделительная.

Различают покровные эпителии (образуют разнообразные выстилки); железистые (образуют железы); сенсорные (выполняют рецепторные функции, входят в состав органов чувств).

1.2.1. Покровный эпителий

Покровный эпителий состоит из эпителиальных клеток – эпителиоцитов, которые плотно прилегают друг к другу, образуя сомкнутые пласты. Межклеточные щели очень узкие и содержат минимальное количество межклеточного вещества. Эпителиоциты соединяются друг с другом межклеточными соединениями (десмосомами, щелевидными контактами, зонами слипания и т.п.), что обуславливает их прочную связь в едином пласте.

Эпителиальные пласты располагаются на базальной мембране – особом структурном образовании, состоящем из аморфного вещества и фибриллярных структур, которое находится между эпителием и соединительной тканью. В образовании базальной мембраны принимают участие как клетки эпителия, так и нижележащая соединительная ткань.

В эпителиях отсутствуют кровеносные сосуды, питание осуществляется путем диффузии веществ через базальную мембрану из сосудов соединительной ткани.

Эпителии характеризуются полярной дифференциацией. В эпителиоцитах различают апикальный полюс (от греч. арех – верхушка), направленный во внешнюю среду, и базальный полюс, обращенный к тканям внешней среды и связанный с базальной мембраной. В многослойных эпителиях клетки поверхностных слоев отличаются от базальных формой, строением и функцией.

Эпителии обладают высокой способностью к регенерации, в их составе имеются стволовые, камбиальные и дифференцированные клетки.

Существует несколько классификаций эпителиев, в основу которых положены различные признаки: происхождение, строение, функции. Наибольшее распространение получила морфологическая классификация, основанная на количестве слоев и форме клеток. Принято подразделять эпителии на однослойные и многослойные. Однослойные делятся на однорядные (плоский, кубический, призматический) и многорядные (мерцательный). Многослойные подразделяются на плоские (ороговевающие, неороговевающие) и переходный.

Однослойные эпителии – эпителиальные ткани, все клетки которых располагаются на базальной мембране. По форме образующих их клеток они подразделяются на плоские, кубические и призматические.

Призматические эпителии могут быть однорядными и многорядными (псевдомногослойными). У однорядного эпителия все клетки имеют одинаковую форму и лежат в один ряд, ядра их расположены на одном уровне. У многорядного эпителия клетки различной формы и высоты, ядра их лежат на разных уровнях.

Однослойный плоский эпителий образует выстилки сосудов – эндотелий, полостей тела – мезотелий (входит в состав серозных оболочек), некоторых почечных канальцев (тонкая часть петли Генле), альвеол и легких (клетки 1-го типа). Однослойный плоский эпителий образован уплощенными клетками с дисковидными ядрами, расположенными в один слой и тесно прилегающими друг к другу (рис. 1). Вследствие небольшой толщины эпителиального пласта через него легко диффундируют газы и быстро транспортируются различные метаболиты.

Однослойный кубический эпителий встречается в почечных канальцах, фолликулах щитовидной железы, выводных протоках желез. Эпителиоциты однотипны по форме, их высота соответствует ширине, содержат ядро сферической формы (рис. 2).

Рис. 1. Однослойный плоский эпителий (мезотелий брюшины):
1 – границы эпителиоцитов;
2 – цитоплазма эпителиоцита;
3 – ядро эпителиоцита

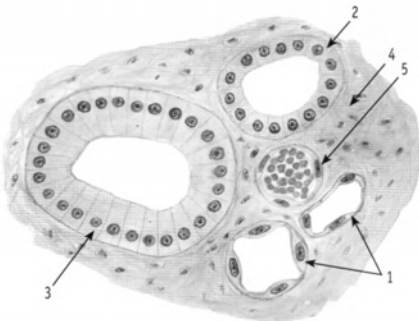
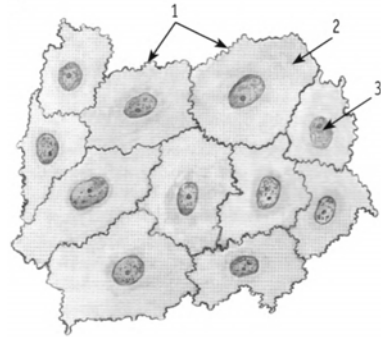


Рис. 2. Однослойные плоский, кубический и столбчатый (призматический) эпителии (мозговое вещество почки):
1 – однослойный плоский эпителий;
2 – однослойный кубический эпителий;
3 – однослойный столбчатый эпителий; 4 – соединительная ткань;
5 – кровеносный сосуд

Однослойный призматический (цилиндрический или столбчатый эпителий) выстилает слизистую оболочку желудка, кишечника, матки, яйцеводов, выводные протоки печени, поджелудочной железы (рис. 3). Эпителиальный пласт состоит из клеток, высота которых значительно превышает ширину. Эпителиоциты обладают резко выраженной полярностью. Ядро эллипсоидной формы лежит вдоль длинной оси клетки и обычно смещено к ее базальной части. В тонком кишечнике клетки эпителия имеют каемку из микроворсинок, образованную выростами плазмолеммы апикальной поверхности эпителиоцита. Микроворсинки увеличивают всасывающую поверхность клетки, а, следовательно, тонкого отдела кишечника.

Однослойный многорядный призматический мерцательный (реснитчатый) эпителий выстилает воздухоносные пути органов дыхания (носовая полость, глотка, гортань, трахея, бронхи), каналцы придатка семенника, слизистую оболочку яйцевода (рис. 4).

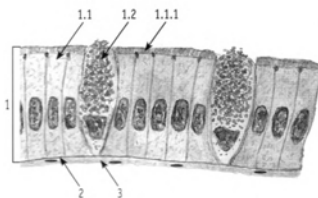


Рис. 3. Однослойный призматический каемчатый (микроворсинчатый) эпителий (тонкая кишка):

1 – эпителий; 1.1 – призматический (микроворсинчатый) эпителиоцит, 1.1.1 – исчерченная (щеточная) каемка, 1.2 – бокаловидный экзокриноцит; 2 – базальная мембрана; 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань

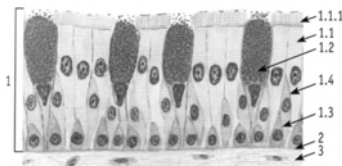


Рис. 4. Однослойный многорядный столбчатый реснитчатый (мерцательный) эпителий (трахея):

1 – эпителий: 1.1 – реснитчатый эпителиоцит, 1.1.1 – реснички, 1.2 – бокаловидный эпителиоцит, 1.3 – низкий вставочный (базальный) эпителиоцит, 1.4 – высокий вставочный эпителиоцит; 2 – базальная мембрана; 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань

В однослойном многоядном призматическом эпителии имеются клетки четырех основных типов: низкие вставочные (базальные), высокие вставочные (промежуточные), мерцательные и бокаловидные. Камбиальными элементами служат низкие вставочные клетки, которые имеют мелкие размеры. Наиболее дифференцированные клетки – мерцательные и бокаловидные. Мерцательные клетки на апикальных полюсах имеют реснички, которые способны улавливать из вдыхаемого воздуха пыль и микрофлору. Бокаловидные клетки вырабатывают слизь, которая увлажняет внутреннюю поверхность дыхательного тракта, способствует оседанию пылевидных частиц.

Многослойные эпителии – эпителии, в которых только часть клеток (образующих базальный слой) располагается на базальной мембране; клетки, входящие в состав остальных слоев, утрачивают с ней связь.

Многослойный эпителий характеризуется наличием трёх основных слоев:

- 1) самый глубокий базальный слой размножающихся клеток;
- 2) средний слой малодифференцированных клеток;
- 3) поверхностный слой дифференцированных клеток.

Клетки базального слоя интенсивно размножаются и заменяют дифференцированные отмирающие клетки. Клетки этого слоя прочно прикреплены к базальной мембране с помощью специальных приспособлений. Из каждой стволовой клетки образуются две дочерние, из которых одна остается на базальной мембране, а вторая выталкивается в вышележащий слой.

Клетки среднего слоя постепенно утрачивают способность к делению, имеют выросты в виде десмосом.

Клетки поверхностного слоя сильно уплощены. Это клетки полностью дифференцированные и быстро отмирающие.

Многослойный плоский неороговевающий эпителий покрывает поверхность роговицы глаза, ротовую полость, пищевод, влагалище, каудальную часть прямой кишки (рис. 5). Образован тремя слоями клеток: базальным, шиповатым и поверхностным.

1. Базальный слой клеток призматической (столбчатой) формы. Клетки, активно делящиеся митозом.

2. Шиповатый слой – уменьшается высота клеток, изменяется форма ядер. В цитоплазме располагаются тонкие нити, состоящие из белка кератина (тонофибриллы), которые выполняют опорную функцию.

3. Поверхностный слой состоит из плоских клеток, утративших способность к митозу. Клетки приобретают форму чешуек и отпадают.

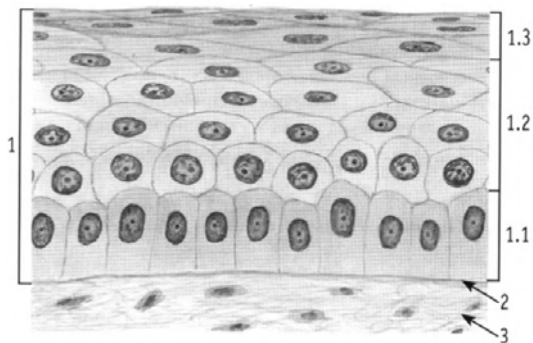


Рис. 5. Многослойный плоский неороговевающий эпителий (роговица):
 1 – эпителий: 1.1 – базальный слой, 1.2 – шиповатый (промежуточный слой),
 1.3 – поверхностный слой; 2 – базальная мембрана;
 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань

Многослойный плоский ороговевающий эпителий покрывает кожу снаружи (эпидермис), выстилает ротовую полость и конечный участок прямой кишки (рис. 6). Он состоит из пяти слоев: базального, шиповатого, зернистого, блестящего и рогового.

1. Базальные клетки, расположенные на базальной мембране, имеют призматическую форму и активно делятся. Большинство этих клеток представлено кератиноцитами. Имеются и другие клетки – меланоциты и беспигментные гранулярные дендрциты. Кератиноциты вырабатывают роговое вещество кератин; меланоциты – кожный пигмент меланин.

2. Клетки шиповатого слоя многогранной формы, перемещаются к поверхности и постепенно уплощаются. Клетки имеют выросты – «шипики», при помощи которых соединяются друг с другом. В цитоплазме имеются тонофибриллы, которые выполняют функцию опорно-защитного каркаса.

3. Зернистый слой состоит из 2-4 рядов плоских клеток, в цитоплазме накапливается кератиногиалиновое вещество в виде базофильных гранул, уменьшается количество органелл.

4. Блестящий слой – клетки лишены ядер и органелл, окрашивается в светлый цвет, зерна кератогиалина сливаются в гомогенную массу – элейдин.

5. Роговой слой состоит из роговых чешуек, не содержащих ядер и органелл и заполненных сетью из толстых пучков кератиновых филаментов, погруженных в плотный матрикс.

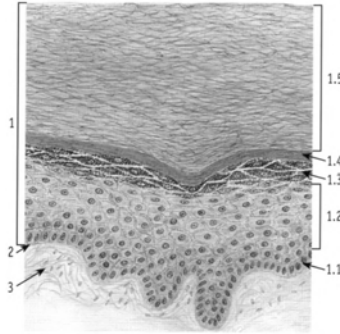


Рис. 6. Многослойный плоский ороговевающий эпителий (эпидермис):
 1 – эпителий: 1.1 – базальный слой, 1.2 – шиповатый слой,
 1.3 – зернистый слой, 1.4 – блестящий слой,
 1.5 – роговой слой; 2 – базальная мембрана;
 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань

Переходный эпителий покрывает внутреннюю поверхность почечной лоханки, мочеточников, мочевого пузыря (рис. 7). При изменении объемов полостей этих органов изменяется толщина эпителиального пласта. Он образован тремя слоями клеток: базальный слой клеток, промежуточных клеток, поверхностный.

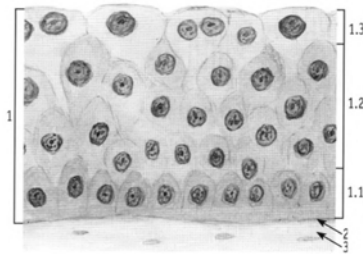


Рис. 7. Переходный эпителий (мочевой пузырь, мочеточник):
 1 – эпителий: 1.1 – базальный слой, 1.2 – промежуточный слой,
 1.3 – поверхностный слой; 2 – базальная мембрана;
 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань

1.2.2. Железистый эпителий

Железистый эпителий, входя в состав эпителиальных тканей, образует большинство желез, хотя той или иной способностью к секреции обладают все ткани.

Железы выполняют секреторную функцию, вырабатывая и выделяя разнообразные продукты (секреты), обеспечивающие различные функции организма.

Железы образованы железистыми клетками – гландулоцитами, вырабатывающими различные секреты. Ядро клеток обычно крупное с преобладанием эухроматина, с одним или несколькими крупными ядрышками. В разные фазы секреторного цикла ядро может менять свое положение в клетке, например, смещаться к базальному полюсу при накоплении секреторных гранул. Цитоплазма гландулоцитов содержит развитый синтетический аппарат: эндоплазматическую сеть, рибосомы, комплекс Гольджи. Так как процессы синтеза и выделения веществ требуют большого количества энергии, в гландулоцитах имеется большое количество митохондрий. Органеллы в цитоплазме клеток желез распределены неравномерно, что связано с их выраженной полярностью.

Существует несколько классификаций желез, которые основаны на учете различных признаков.

В зависимости от того, куда выводится секрет, железы делят на две большие группы: с внутренней секрецией (эндокринные) и с внешней секрецией (экзокринные) (рис. 8, 9). Эндокринные железы не имеют выводных протоков и выделяют вырабатываемые ими вещества (гормоны или инкреты) в кровь или лимфу. Экзокринные железы имеют выводные протоки и выделяют секрет во внешнюю среду (на поверхность тела или в просвет внутренних органов).

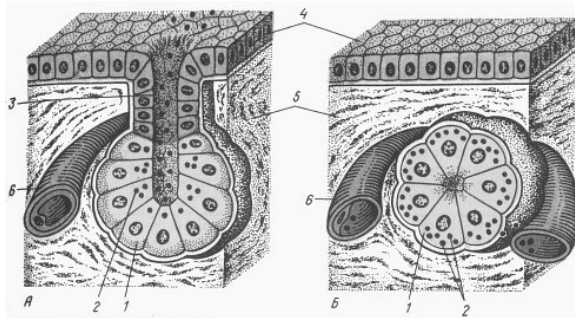
Железы по количеству клеток подразделяются на одноклеточные (например, бокаловидные клетки, клетки диффузной эндокринной железы) и многоклеточные.

По расположению относительно эпителиального пласта различают эндоэпителиальные и экзоэпителиальные железы. Одноклеточные железы всегда эндоэпителиальные – залегают в пласте эпителия. Многоклеточные, как правило, – экзоэпителиальные, лежат за пределами эпителиального пласта.

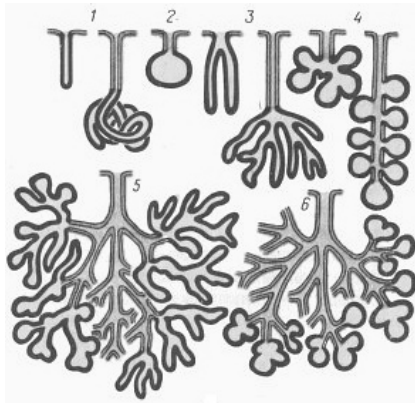
В экзокринных железах выделяют концевые (секреторные) отделы и выводные протоки.

Концевые (секреторные) отделы состоят из железистых клеток, которые продуцируют секрет. В некоторых (потовых, молочных, слюнных) железах концевые отделы помимо железистых клеток содержат отростчатые миоэпителиальные клетки – видоизмененные эпителиоциты с развитым сократительным аппаратом. Миоэпители-

альные клетки охватывают снаружи железистые и, сокращаясь, способствуют выведению секрета из концевой отдела.



*Рис. 8. Схема строения экзокринных и эндокринных желез:
 А – экзокринная железа, Б – эндокринная железа;
 1 – концевой отдел, 2 – секреторные гранулы,
 3 – выводной проток экзокринной железы, 4 – покровный эпителий,
 5 – соединительная ткань, 6 – кровеносный сосуд*



*Рис. 9. Схема строения простых и сложных экзокринных желез:
 1 – простые трубчатые железы с неразветвленными концевыми отделами;
 2 – простая альвеолярная железа с неразветвленным концевым отделом;
 3 – простая трубчатая железа с разветвленными концевыми отделами;
 4 – простые альвеолярные железы с разветвленными концевыми отделами;
 5 – сложная альвеолярно-трубчатая железа
 с разветвленными концевыми отделами;
 6 – сложная альвеолярная железа с разветвленными концевыми отделами*

Выводные протоки связывают концевые отделы с покровными эпителиями и обеспечивают выделение синтезированных продуктов на поверхность тела или в полость органов.

Характер ветвления выводных протоков различен, поэтому они подразделяются на простые и сложные. У *простых желез* неветвящийся выводной проток, у *сложных* – ветвящийся.

По формам концевых отделов железы подразделяются на *трубчатые*, *альвеолярные* (сферические) и *трубчато-альвеолярные* или *альвеоларно-трубчатые*.

По ветвлению концевых отделов различают *неразветвленные* и *разветвленные*.

По типу секреции, т.е. на основании того, как образуется секрет и каким путем он выделяется из клеток, различают железы мерокриновые, апокриновые и голокриновые. При *мерокриновом* типе секреции образовавшийся секрет в виде капель или гранул выходит из клетки без разрушения ее цитоплазмы. При *апокриновом* типе апикальная часть клеточной мембраны незначительно нарушается, и часть цитоплазмы отделяется вместе с каплей секрета. При *голокриновом* типе секреции происходит полное разрушение секреторных клеток с выделением секрета в выводной проток железы. На месте разрушившихся образуются новые секреторные клетки. Большинство желез относится к мерокриновым; апокриновых желез немного (например, часть потовых и молочные), к голокриновым относятся лишь сальные железы.

По химическому составу вырабатываемого секрета экзокринные железы подразделяют на *белковые* (серозные), *слизистые* и *серозно-слизистые* (смешанные), *липидные*.

1.3. Опорно-трофические (соединительные) ткани

Опорно-трофические ткани развиваются в эмбриональном периоде из общего источника – мезенхимы и состоят из клеток и межклеточного вещества. Межклеточное вещество является совокупным продуктом деятельности клеток, его состав, биологические и физико-химические свойства очень разнообразны, и в некоторых тканях оно играет ведущую роль (например, в хрящевых и костных, где его прочность обеспечивает выполнение опорной функции тканей).

Наиболее общая функция соединительных тканей – поддержание постоянства внутренней среды организма (гомеостатическая); она включает многообразные функции, к которым относятся:

- 1) трофическая – обеспечение других тканей питательными веществами;
- 2) дыхательная – обеспечение газообмена;
- 3) регуляторная – участие в регуляции обмена веществ с помощью биологически активных веществ (гормонов), циркулирующих в крови;
- 4) защитная – фагоцитоз и выработка иммунных тел;
- 5) транспортная – перенос веществ;
- 6) опорная, механическая – образует строму, капсулы, сухожилия, связки, хрящи, кости.

Классификация соединительных тканей выделяет среди них 5 подгрупп.

1. Кровь, лимфа.
2. Кроветворные ткани:
 - а) лимфоидные;
 - б) миелоидные.
3. Волокнистые соединительные ткани (собственно соединительные ткани):
 - а) рыхлая волокнистая соединительная ткань;
 - б) плотная волокнистая соединительная ткань:
 - 1) оформленная;
 - 2) неоформленная.
4. Соединительные ткани со специальными свойствами:
 - а) жировая;
 - б) ретикулярная;
 - в) слизистая;
 - г) пигментная.
5. Скелетные соединительные ткани:
 - а) хрящевая (волокнистая, гиалиновая, эластическая);
 - б) костная (грубоволокнистая, пластинчатая).

1.3.1. Кровь и лимфа

Кровь – жидкая ткань внутренней среды, обуславливающая газообмен, обмен веществ в организме животных и нейрогуморальную регуляцию.

Кровь состоит из форменных элементов крови (40-45% от объема крови) и межклеточного вещества – плазмы (55-60% от объема крови). Форменные элементы крови представлены эритроцитами, лейкоцитами и кровяными пластинками (тромбоцитами) (рис. 10).

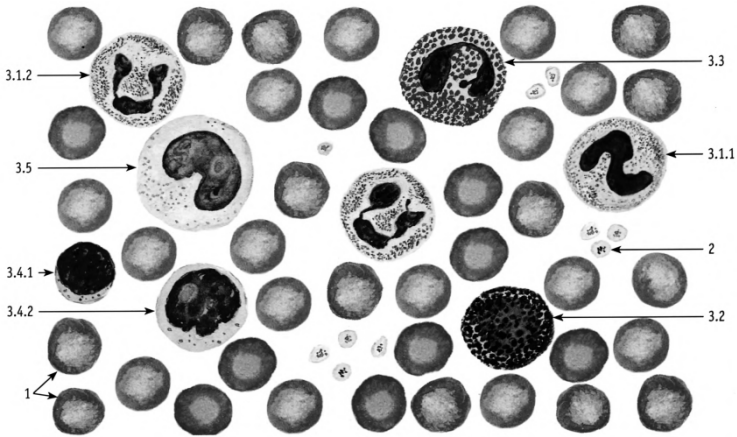


Рис. 10. Кровь (мазок): 1 – эритроциты, 2 – тромбоциты, 3 – лейкоциты: 3.1 – нейтрофильные гранулоциты: 3.1.1 – палочкоядерный, 3.1.2 – сегментоядерный, 3.2 – базофильный гранулоцит, 3.3 – эозинофильный гранулоцит; 3.4 – лимфоциты: 3.4.1 – малый лимфоцит, 3.4.2. – средний лимфоцит, 3.5 – моноцит

Плазма крови – желтоватая, полупрозрачная жидкость. В ней содержится 90-92% воды, 8-10% сухого вещества, в котором 6-8% составляют белки (альбумины, глобулины, фибриноген, ферменты, гормоны), жиры – 0,8%, глюкоза – 0,12, мочевины – 0,05, минеральные соли – 0,9%. На долю крови приходится 6-8% массы тела животного.

Сыворотка крови – жидкость, остающаяся после свертывания крови. По своему составу она сходна с плазмой крови, однако в ней отсутствуют фибриноген и факторы свертывания.

Форменные элементы крови включают эритроциты, лейкоциты, тромбоциты.

Эритроциты – наиболее многочисленные форменные элементы крови, у млекопитающих они представляют собой постклеточные структуры, утратившие в процессе развития ядро и почти все органеллы. Эритроциты у птиц овальной формы, ядро крупное, темное, повторяет форму клеток.

Форма эритроцитов – двояковогнутый диск диаметром 3-8 мкм и толщиной 0,8 мкм в центре и до 3,5 мкм по периферии. Оболочка зрелого эритроцита очень эластичная и в узких капиллярах приобретает вытянутую форму. Цитоплазма заполнена железосодержащим белко-

вым пигментом – гемоглобином (составляет 33% массы цитоплазмы). Гемоглобин определяет цвет эритроцитов (желтоватый у отдельных элементов и красный при их больших скоплениях) и осуществляет дыхательную функцию. Кислород при высоком парциальном давлении (в крови легочных капилляров) растворяется в плазме крови и переходит в эритроциты, где связывается с гемоглобином, образуя непрочное соединение – оксигемоглобин.

При низком артериальном давлении кислород (в капиллярах периферических тканей) отщепляется от гемоглобина и переходит в плазму крови, оттуда в ткани. Углекислый газ в результате разницы парциального давления переходит из тканей в капилляры, соединяется с гемоглобином и переносится в легкие.

Эритроциты кроме транспортировки газов способны переносить на своей поверхности ряд биологически активных веществ, в том числе иммуноглобулины, иммунные комплексы, аминокислоты, ферменты и др.

Эритроциты образуются в красном костном мозге, функционируют в крови в среднем 100-120 суток, а затем разрушаются макрофагами селезенки и (в меньшей степени) печени и красного костного мозга. У млекопитающих в 1 мм³ крови содержится от 5 до 10 млн эритроцитов.

Лейкоциты – (белые кровяные клетки) – бесцветные ядерные клетки округлой или амебовидной формы, обладающие способностью к активному передвижению. Лейкоциты мигрируют из кровеносных сосудов в соединительную ткань и участвуют в различных защитных реакциях. Лейкоциты обладают способностью к фагоцитозу, вырабатывают биологически активные вещества.

В 1 мм³ крови млекопитающих общее количество лейкоцитов составляет 5-10 тыс.

В зависимости от наличия в цитоплазме зернистости лейкоциты делятся на две большие группы: зернистые лейкоциты, или гранулоциты, и незернистые, или агранулоциты.

Гранулоциты содержат в цитоплазме гранулы с окислительными ферментами, гепарином, гистамином и серотонином. Имеют сегментированное ядро и не способны к делению. В зависимости от того, как окрашивается зернистость, гранулоциты делят на три группы: эозинофильные, базофильные и нейтрофильные. При окраске крови смесью кислого (эозин) и основного (азур) красителей зернистость в одних лейкоцитах (эозинофильные) окрашивается кислыми красителями, в

других (базофильные) – основными, в третьих (нейтрофильные) – и теми, и другими.

Нейтрофилы – округлые клетки диаметром 7-9 мкм. Ядро в зависимости от зрелости клетки может быть бобовидным – юный нейтрофил, подковообразным – молодой палочкоядерный нейтрофил или сегментированной формы – зрелый сегментоядерный нейтрофил. В цитоплазме нейтрофилов имеется мелкая зернистость, окрашенная в розово-фиолетовый цвет. В цитоплазме нейтрофилов имеются все органеллы и различные включения. Клетки богаты лизосомами, содержащими протеолитические ферменты, и пероксисомами. Нейтрофилы осуществляют активный фагоцитоз микробов. *Нейтрофилов* в крови коровы – 31%, лошади – 54, свиньи – 36% от всех лейкоцитов.

Эозинофилы – крупные клетки диаметром 12-18 мкм. Ядра красятся бледно, имеют бобовидную или слабосегментированную форму; в цитоплазме находятся крупные ярко-красные зерна. Они состоят из белков и липидов, содержат фосфор, железо и различные ферменты. Эозинофилы способны обезвреживать чужеродные белки. Эозинофилов в крови коровы – 6%, лошади – 3, свиньи – 8% от всех лейкоцитов.

Базофилы имеют диаметр 8-14 мкм, ядра бобовидной или лопастной формы. В цитоплазме красно-фиолетовая зернистость. Гранулы содержат биологически активные вещества: гепарин, гистамин, серотонин и др. Базофилы регулируют процесс свертывания крови, проницаемость сосудов и транспорт биологических веществ. Базофилов в крови у коровы – 0,1%, лошади – 0,5, свиньи – 1,5% от всех лейкоцитов.

Агранулоциты делят на две группы: лимфоциты и моноциты. От гранулоцитов эти клетки отличаются отсутствием зернистости в цитоплазме, и ядра их не сегментированы.

Лимфоциты различают большие (диаметр 10-18 мкм), средние (6,5-10 мкм) и *малые* (4,5-6,5 мкм). Лимфоциты имеют округлую или слегка овальную форму, при созревании уменьшаются в размерах. Лимфоциты участвуют в формировании иммунитета, обладают фагоцитарной активностью. В крови коровы их до 80%, лошади – 40, свиньи – 57% от всех лейкоцитов. В периферической крови циркулируют средние и малые лимфоциты. Среди малых лимфоцитов различают Т-лимфоциты, В-лимфоциты и лимфоцитоподобные стволовые клетки. Различия между ними видны лишь в электронный микроскоп и при иммуно-химических исследованиях. Т-лимфоциты – долгоживущие клетки, составляют до 70% всех малых лимфоцитов крови, отвечают за клеточный иммунитет. В-лимфоциты – короткоживущие

предшественники плазматических клеток, отвечают за гуморальный иммунитет. Лимфоцитоподобные стволовые недифференцированные клетки, вселяясь в органы кроветворения, могут дифференцироваться в любые лимфоциты.

Моноциты – самые крупные клетки крови диаметром 10-20 мкм с хорошо развитой цитоплазмой и крупным округлым или подковообразным слабосегментированным ядром. Моноциты обладают сильной фагоцитарной активностью. Поглощают остатки отмерших клеток, бактериальные клетки и инородные частицы. Выселяясь из кровеносного русла, они дифференцируются в макрофаги различных тканей и органов. В крови у коровы и свиньи их 5%, лошади и овцы – 3% от всех лейкоцитов.

Тромбоциты – или кровяные пластинки – мелкие дисковидные безъядерные фрагменты цитоплазмы, отделившиеся от гигантских клеток костного мозга – мегакариоцитов. Тромбоциты принимают участие в свертывании крови. В 1 мм³ крови – 250-350 тыс. кровяных пластинок. В сосудистой крови пластинки живут около 9-10 суток, после чего происходит их фагоцитоз, главным образом, макрофагами селезенки.

Лимфа – биологическая жидкость, образующаяся из интерстициальной (тканевой) жидкости, проходящая по системе лимфатических сосудов через цепочку лимфатических узлов (в которых она очищается и обогащается форменными элементами) и через грудной проток попадающая в кровь.

Лимфа состоит из жидкой части (плазмы) и форменных элементов.

Плазма лимфы по концентрации и составу солей близка к плазме крови, обладает щелочной реакцией (рН 8,4-9,2), содержит меньше белков и отличается от плазмы крови по их составу. Концентрация форменных элементов – 2-20 тыс/мкл.

Клеточный состав лимфы: лимфоцитов – 90%, моноцитов – 5, эозинофилов – 2, сегментоядерных нейтрофилов – 1 и других клеток – 2%. Эритроциты в норме в лимфе отсутствуют.

Благодаря присутствию тромбоцитов, фибриногена и других факторов свертывания лимфа способна свертываться, образуя сгусток.

Лимфа выполняет защитную, дренажную функции, способствует обезвреживанию токсинов и ядовитых продуктов обмена веществ. Активно участвует в обмене веществ с кровью. Через лимфу происходит усвоение продуктов расщепления жиров (глицерина и жирных кислот) в тонком кишечнике.

1.3.2. Рыхлая волокнистая соединительная ткань

Рыхлая соединительная ткань – самый распространенный вид ткани, т.к. она сопровождает все кровеносные сосуды, формирует прослойки внутри органов, входит в состав кожи и слизистых оболочек внутренних полостных органов.

Функции рыхлой соединительной ткани: 1) трофическая; 2) защитная; 3) пластическая (участие в восстановительных процессах при повреждении).

Рыхлая соединительная ткань состоит из клеток, коллагеновых и эластических волокон и межклеточного аморфного вещества.

Клетки рыхлой соединительной ткани по принципу постоянства подразделяются на оседлые: адвентициальные, фибробласты, фиброциты, жировые клетки и блуждающие: все виды лейкоцитов, поступающие из крови. Макрофаги, плазматические и тучные клетки дифференцируются из предшественников, циркулирующих в крови.

1. Адвентициальные клетки – вытянутые клетки звездчатой формы с овальным ядром. Располагаются вдоль наружной поверхности стенки капилляров. Могут превращаться в фибробласты и липоциты.

2. Фибробласты – постоянные и наиболее многочисленные клетки всех видов соединительных тканей. Эти клетки вырабатывают межклеточное вещество и специфические белки (проколлаген, проэластин, ферментные белки). Фибробласты способны к делению и обладают подвижностью. По мере старения преобразуются в фиброциты и утрачивают способность к делению.

3. Гистиоциты – макрофаги, вторые по численности. В цитоплазме имеются вакуоли и включения. Ядро небольшое, тёмное, цитоплазма плотная, органоиды развиты слабо. На плазмолемме имеются ворсинки, псевдоподии. Непосредственные предшественники – моноциты крови. В соединительной ткани макрофаги располагаются одиночно или группами. Макрофаги мигрируют в очаг воспаления и становятся доминирующими клетками. Функция – распознавание, поглощение и переваривание поврежденных, опухолевых, погибших клеток, компонентов межклеточного вещества, а также экзогенных материалов и микроорганизмов.

4. Тканевые базофилы (лаброциты, тучные клетки) – овальной или шаровидной формы размером от 10 до 30 мкм с небольшим ядром. В цитоплазме содержатся в виде гранул гепарин и биологические амины – гистамин, серотонин, дофамин, имеющие фармакологическое действие. Гистамин повышает проницаемость стенки капилляров, стимули-

рует миграцию эозинофилов. Гепарин препятствует свертыванию крови. Участвуют тучные клетки при развитии аллергических и анафилактических реакций.

5. Плазмоциты небольшие, овальной формы, осуществляют иммунологические реакции. Содержат мощный белоксинтезирующий аппарат, осуществляет синтез антител.

6. Жировые клетки (липоциты, адипоциты) располагаются рядом с капиллярами. Клетки крупные, округлой формы, содержащие жировые капли. Ядро и цитоплазма с органеллами оттеснены жиром к оболочке клетки. В эмбриогенезе липоциты возникают из клеток мезенхимы, в постэмбриональный период образуются из адвентициальных клеток или малодифференцированных фибробластов. Выполняют функцию запаса питательных веществ в ткани.

7. Пигментные клетки малочисленные и мелкие – имеют отростчатую форму. В цитоплазме содержат зерна пигмента. Делятся на хроматофоры и меланоциты. Обеспечивают цветовой оттенок ткани.

Межклеточное вещество рыхлой соединительной ткани образовательно основным (аморфным) веществом, коллагеновыми, эластическими и ретикулярными волокнами.

Коллагеновые волокна образованы белками коллагенами, обеспечивают механическую прочность ткани, способны объединяться в пучки, при варке выделяют клейкое вещество (коллаген – клей). Каждое волокно состоит из тонких фибрилл, расположенных параллельно друг другу.

Эластические волокна обладают малой прочностью и высокой эластичностью. Состоят из белка эластина (90%) и микрофибрилл. Эластические волокна соединяются друг с другом, формируя трёхмерные сети.

Ретикулярные волокна по своей природе являются коллагеновыми, основная функция – опорная. Эти волокна выявляются солями серебра, их место расположения – кроветворные органы.

Основное аморфное вещество рыхлой волокнистой соединительной ткани заполняет промежутки между волокнами и окружает клетки. Основное вещество – гелеобразная масса, способная в широких пределах менять свою консистенцию. По химическому составу это сложный комплекс веществ, основу его составляют гликозамингликаны, протеогликаны, гликопротеиды – вещества белково-углеводной природы. В его состав входят также белки плазмы крови, гормоны, пептиды, аминокислоты, вода и неорганические вещества (рис. 11).

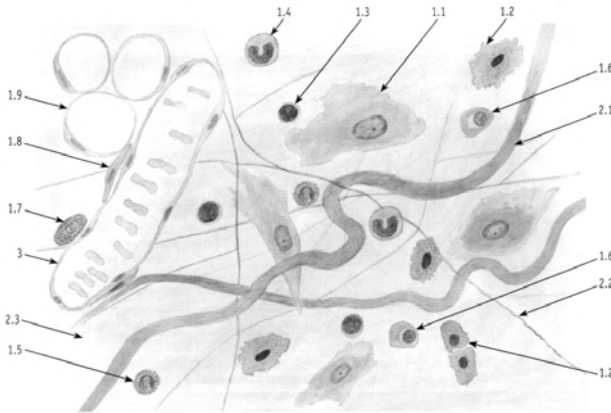


Рис. 11. Рыхлая волокнистая соединительная ткань (пленочный препарат):
 1 – клетки: 1.1 – фибробласт, 1.2 – гистиоцит (макрофаг), 1.3. – лимфоцит,
 1.4 – моноцит, 1.5 – эозинофил, 1.6 – плазмоцит, 1.7 – тучная клетка,
 1.8 – адвентициальная клетка, 1.9 – адипоцит; 2 – межклеточное вещество:
 2.1 – коллагеновое волокно, 2.2 – эластичное волокно, 2.3 – основное
 (аморфное) вещество; 3 – кровеносный сосуд

1.3.3. Плотные волокнистые соединительные ткани

Плотная неоформленная соединительная ткань образует сетчатый слой кожи, надхрящницу, надкостницу, различные капсулы и характеризуется большим количеством пучков коллагеновых и эластических волокон, идущих в различных направлениях и формирующих сложную трехмерную систему. Клеток и межклеточного вещества в ней мало. К клеткам относятся фибробласты и фиброциты, располагающиеся между волокнами. Между пучками коллагеновых волокон встречаются эластические волокна (рис.12).

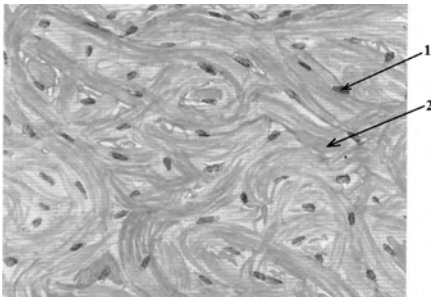


Рис. 12. Плотная неоформленная соединительная ткань (дерма кожи):
 1 – ядра фиброцитов;
 2 – коллагеновые волокна

Плотная оформленная коллагеновая ткань образует сухожилия, связки, фасции и апоневрозы. Сухожилие состоит из коллагеновых волокон, идущих в одном направлении параллельно друг другу и связанных небольшим количеством аморфного межклеточного вещества.

Каждое коллагеновое волокно состоит из многочисленных фибрилл и обозначается как пучок I порядка. Между пучками I порядка лежат клетки фиброциты и располагается тонкая сеть эластических волокон, которая выявляется специальными красителями. Несколько пучков I порядка, окруженных снаружи оболочкой из рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани – эндотендием, образующих пучки II порядка, а несколько пучков II порядка, окруженных снаружи оболочкой из плотной волокнистой соединительной ткани – перитендием, формируют пучки III порядка. Сухожилие в целом окружено общей оболочкой – эпитендием. В прослойках соединительной ткани проходят кровеносные и лимфатические сосуды и нервные волокна.

Связки соединяют кости друг с другом и по строению сходны с сухожилиями, но отличаются от них менее строго ориентированным расположением коллагеновых волокон.

Фасции и апоневрозы образованы плотной волокнистой соединительной тканью, в которой пучки коллагеновых волокон и фиброциты располагаются в виде пластин (мембран).

Плотная оформленная эластическая ткань образована сетью толстых продольно-вытянутых эластических волокон, между которыми залегают тонкие коллагеновые волокна и фиброциты (рис. 13). Из этой ткани образована вейная и голосовые связки, эта ткань присутствует в крупных артериях.

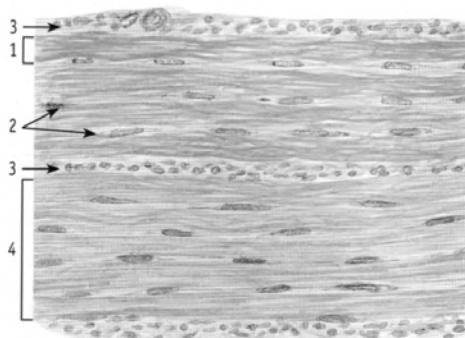


Рис. 13. Плотная оформленная коллагеновая ткань (сухожилие, продольный разрез):
 1 – коллагеновое волокно (пучок I порядка);
 2 – ядра фиброцитов;
 3 – прослойка соединительной ткани; 4 – пучок II порядка

1.3.4. Жировая ткань

Жировая ткань представляет собой особую разновидность соединительных тканей со специальными свойствами, в которой основной объем занимают жировые клетки – липоциты (адипоциты). Хорошо развита и выражена у всех видов сельскохозяйственных животных.

Жировая ткань является депо жира и воды, участвует в процессах теплорегуляции и обмена веществ, а также выполняет механическую функцию, предохраняя органы от повреждений.

Различают два вида жировой ткани – белую и бурую.

Белая жировая ткань состоит из долек (компактных скоплений липоцитов), разделенных тонкими прослойками рыхлой волокнистой соединительной ткани, по которым проходят кровеносные сосуды и нервы. Липоциты крупные, шаровидной формы (до 120 мкм в диаметре), в жировых дольках плотно прилегают друг к другу и нередко приобретают форму многогранников. Ядро уплощено и смещено к краю клетки. Цитоплазма содержит одну крупную жировую каплю, занимающую до 90-98% ее объема. Остальная часть цитоплазмы образует тонкий ободок вокруг жировой капли и вокруг ядра, где расположено большинство органелл. Белая жировая ткань в значительном количестве содержится в подкожной жировой клетчатке, вокруг почек, в брыжейке.

Бурая жировая ткань имеется у грызунов и животных, впадающих в зимнюю спячку, а также у плодов и новорожденных животных других видов. Располагается преимущественно под кожей между лопатками, в шейной области, в средостении и вдоль аорты. Бурая жировая ткань, так же как и белая, образована дольками, состоящими из липоцитов. Соединительно-тканые прослойки очень тонкие и содержат многочисленные капилляры. Липоциты бурой жировой ткани имеют более мелкие размеры (до 60 мкм) и полигональную форму. Округлое ядро располагается, как правило, в центре, а цитоплазма содержит множественные жировые капли различных размеров.

1.3.5. Ретикулярная ткань

Ретикулярная ткань образует строму кроветворных органов (костного мозга, лимфатических узлов, селезенки) и обеспечивает развитие форменных элементов крови путем создания необходимого микроокружения для развивающихся клеток крови, выполняя целый ряд функций: опорную, трофическую, секреторную, фагоцитарную.

Ретикулярная ткань состоит из ретикулярных клеток и основного аморфного вещества, в котором во всех направлениях проходят ретикулярные волокна.

Ретикулярные клетки – крупные отростчатые фибробластоподобные, имеют большое округлое центрально расположенное светлое ядро с крупным ядрышком. Ретикулоциты соединяются друг с другом своими отростками и плотно переплетаются с ретикулярными волокнами, образуя сеть. Кровь, поступающая в ретикулярную ткань, обогащается клетками крови.

Ретикулярная ткань с возрастом у животных заменяется жировой тканью, количество ее уменьшается.

1.3.6. Хрящевая ткань

Хрящевая ткань – специализированный вид соединительной ткани, выполняющий опорную функцию. Развивается из мезенхимы, состоит из клеток хондроцитов и волокон, заключенных в большое количество плотного основного вещества.

Различают три основных вида хрящевой ткани: гиалиновый, эластический и волокнистый.

Гиалиновый хрящ наиболее распространен. Из него построена большая часть скелета у зародыша. Во взрослом организме он встречается в ребрах, на суставных поверхностях костей, по всему протяжению воздухоносных путей.

Снаружи хрящ одет тонким слоем соединительной ткани – надхрящницей, содержащей сосуды. Надхрящница состоит из вытянутых в длину мелких клеток – хондробластов и из пучков коллагеновых волокон. Рост хрящевой ткани осуществляется за счет размножения хондробластов.

Хрящевые клетки, или хондроциты, располагаются в особых полостях в межклеточном веществе в одиночку или группами по две клетки и более. Такие клеточные группы получили название изогенных, т.к. они образуются путем деления одной родоначальной хрящевой клетки.

В поверхностных слоях хряща хондроциты мало отличаются от клеток надхрящницы и имеют веретеновидную форму. В более глубоких слоях хрящевые клетки постепенно увеличиваются в размерах и округляются. В цитоплазме зрелых хондроцитов клеточный центр локализован около ядра. Комплекс Гольджи, агранулярная и гранулярная ЭПС хорошо развиты, что свидетельствует об активности процес-

сов синтеза компонентов межклеточного вещества: его белков, гликозамингликанов, протеогликанов. Цитоплазма клеток содержит включения гликогена и липидов.

Межклеточное вещество гиалинового хряща состоит из коллагеновых (хондриновых) волокон и основного вещества (рис. 14).

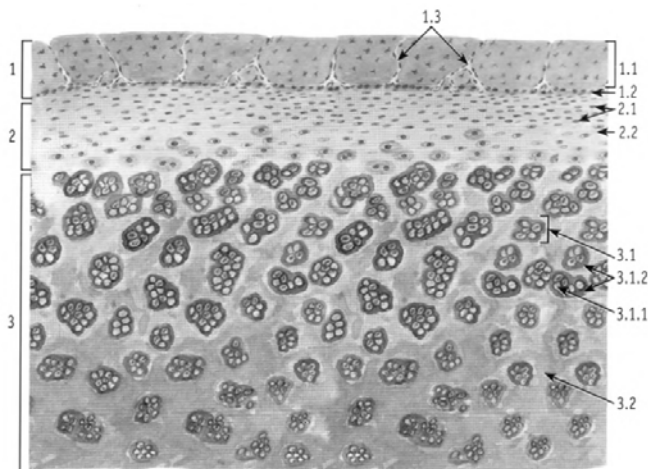


Рис. 14. Гиалиновая хрящевая ткань (гиалиновый хрящ):

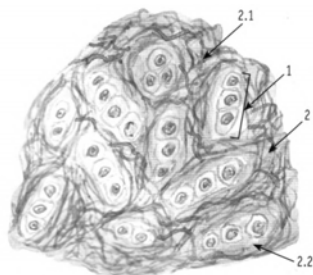
- 1 – надхрящница: 1.1 – наружный фиброзный слой,
1.2 – внутренний (хондрогенный) клеточный слой, 1.3 – кровеносные сосуды;
2 – зона молодого хряща: 2.1 – хондроциты, 2.2 – межклеточное вещество (матрикс); 3 – зона зрелого хряща: 3.1 – клеточная территория,
3.1.1 – изогенная группа хондроцитов, 3.1.2 – территориальный матрикс,
3.2 – интертерриториальный матрикс*

В состав основного вещества входят сульфатированные и несulfатированные гликозаминогликаны, протеогликаны, липиды и неколлагеновые белки. Концентрация гликозамингликанов выше вокруг изогенных групп клеток центральной части, о чем свидетельствует их базофилия.

Коллагеновые фибриллы хряща тонки и не превышают 10 нм в диаметре и неразличимы в световой микроскоп. Межклеточное вещество не содержит кровеносных сосудов; питание ткани происходит путем диффузии, 15% межклеточного вещества приходится на жидкость, если хрящ кальцинируется, он погибает.

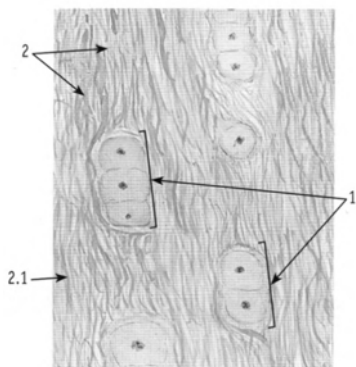
Эластический хрящ образует скелет наружного уха, слухового прохода, евстахиевых труб, содержится в некоторых хрящах гортани (надгортаннике, черпаловидных) (рис. 15).

Эластический хрящ отличается от гиалинового хряща тем, что в его межклеточном веществе наряду с коллагеновыми волокнами имеются хорошо развитые разветвленные эластические волокна, пронизывающие межклеточное вещество во всех направлениях. Эластические волокна переходят в ткань надхрящницы.



*Рис. 15. Эластичная хрящевая ткань. Участок эластичного хряща:
1 – изогенная группа хондроцитов; 2 – межклеточное вещество (матрикс):
2.1 – эластические волокна, 2.2 – основное вещество*

Волокнистый хрящ локализуется в составе межпозвоночных дисков, круглой связки бедра, в симфизах лонных костей. Межклеточное вещество волокнистого хряща содержит грубые пучки параллельно идущих коллагеновых волокон, между которыми рядами лежат хондробласты. Волокнистый хрящ является переходной формой между гиалиновым хрящом и плотной соединительной тканью (рис. 16).



*Рис. 16. Волокнистая хрящевая ткань:
1 – изогенные группы хондроцитов;
2 – межклеточное вещество (матрикс):
2.1 – коллагеновые волокна*

1.3.7. Костная ткань

Костная ткань – одна из самых твердых в организме, по плотности ее превосходит только эмаль зуба. Из этой ткани состоит скелет позвоночных.

Выполняет опорную, защитную, кроветворную функции, активно участвует в обмене веществ.

В костной ткани содержится воды – 10-30%, органических – 20-50, минеральных веществ – 40-70%.

Костная ткань перестраивается при изменении условий жизнедеятельности, обмена веществ в связи с возрастом, диетой, активностью функции желез внутренней секреции и др. Состоит из клеток и межклеточного вещества.

Костная ткань содержит четыре различных вида клеток: остеогенные клетки, остеобласты, остеоциты и остеокласты.

Остеогенные клетки – клетки ранней стадии специфической дифференцировки мезенхимы в процессе остеогенеза. Имеют бледное ядро и слабоокрашивающуюся цитоплазму. Располагаются в зонах формирования костной ткани: в надкостнице, эндоосте, гаверсовых каналах. Из остеогенных клеток образуются остеобласты, за счет которых происходит рост и перестройка костей скелета.

Остеобласты – клетки, продуцирующие органические элементы межклеточного вещества костной ткани: коллаген, гликозамингликаны, белки и др. Диаметр остеобластов – 15-20 мк в диаметре. Ядро округлой или овальной формы, часто располагающееся эксцентрично, содержит одно или несколько ядрышек. В цитоплазме имеется хорошо развитая зернистая ЭПС, свободные рибосомы, комплекс Гольджи.

Остеоциты – клетки костной ткани, образующиеся из остеобластов. Остеоциты имеют отростчатую форму, лежат в особых полостях межклеточного вещества – лакунах, соединенных между собой многочисленными костными каналцами. Система лакун и костных каналцев содержит тканевую жидкость и обеспечивает обмен веществ, необходимый для жизнедеятельности костных клеток.

Остеокласты – крупные многоядерные клетки от 20 до 100 мкм в диаметре – это клетки, принимающие активное участие в разрушении обезвещенного хряща и кости. В том месте, где остеокласт соприкасается с костным веществом, в последнем образуется бухточка, или гаушитовская лакуна. У молодых животных этих лакун мало, у старых – много.

Межклеточное вещество костной ткани состоит из основного вещества, в котором располагаются волокна и содержатся неорганические соли. Основное вещество состоит из гликопротеидов, сульфатированных гликозамингликанов, белков и неорганических соединений.

Волокна называются оссеиновыми и по строению не отличаются от коллагеновых волокон рыхлой волокнистой соединительной ткани.

Неорганические вещества кости представлены в основном солями кальция. 99% всего кальция в организме располагается в костной ткани.

В соответствии со структурной организацией межклеточного вещества, в частности, степени упорядоченности расположения в нем оссеиновых (коллагеновых) волокон выделяют грубоволокнистую костную ткань и пластинчатую.

Грубоволокнистая костная ткань характеризуется неупорядоченным расположением толстых пучков оссеиновых волокон. Остеоциты лежат между волокнами и имеют уплощенную форму.

У высших позвоночных грубоволокнистая кость встречается у зародышей, а у взрослых – в очень немногих местах скелета, в зубных альвеолах, в области прикрепления сухожилий и связок, на месте зарастающих черепных швов.

Пластинчатая костная ткань у взрослых животных образует практически весь костный скелет и состоит из пластинок костной ткани, в межклеточном веществе которых проходят тонкие оссеиновые волокна, ориентированные в одном направлении (рис. 17). Волокна соседних пластинок лежат под углом друг к другу, что способствует равномерному распределению действующих на них нагрузок. Между пластинками располагаются клеточные полости – лакуны, содержащие тела остеоцитов. Лакуны соединяются костными канальцами, в которых находятся отростки клеток. Костные канальцы пронизывают пластинки под прямым углом.

В пластинчатой кости различают губчатое и компактное вещество. В губчатом веществе в эпифизах трубчатых костей положение костных пластинок может быть разнообразным. Ячеи губчатого вещества кости содержат красный костный мозг.

В компактном веществе группы костных пластинок толщиной 4-15 мкм плотно примыкают друг к другу и формируют три системы костных пластинок: 1) наружный слой общих, или генеральных пластинок; 2) остеонный слой, содержащий остеоны и вставочные системы костных пластинок; 3) внутренний слой общих пластинок.

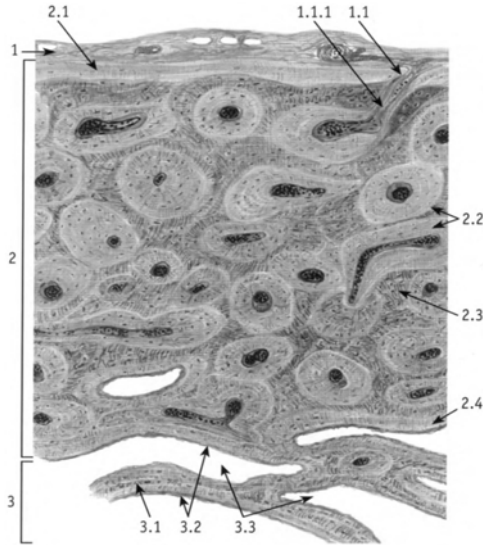


Рис. 17. Пластинчатая костная ткань

(поперечный срез диафиза трубчатой кости):

1 – надкостница: 1.1 – прободающий (фолькмановский) канал,

1.1.1 – кровеносный сосуд; 2 – компактное вещество кости:

2.1 – наружные общие пластинки, 2.2 – остеоны,

2.3 – вставочные пластинки, 2.4 – внутренние общие пластинки;

3 – губчатое вещество кости: 3.1 – костные трабекулы,

3.2 – эндоост, 3.3 – межтрабекулярные пространства

Пластинки наружной общей системы следуют параллельно поверхности кости. Остеоциты располагаются между пластинками. Из надкостницы через этот слой кости проходят прободающие каналцы, несущие в кость кровеносные сосуды и пучки коллагеновых волокон.

В остеонном слое костные пластинки располагаются вокруг канала, где проходят кровеносные сосуды. Остеонный слой образует основную массу компактного вещества, содержит остеоны и вставочные пластины.

Остеоны – структурно-функциональные единицы пластинчатой костной ткани. Они имеют вид цилиндров диаметром 100-500 мкм и длиной до нескольких сантиметров. Каждый остеон состоит из 3-25 костных пластинок, расположенных концентрически вокруг канала остеона (гаверсова канала). Орсеиновые волокна одной костной

пластинки располагаются под углом 90° к волокнам другой рядом расположенной пластинки, что обеспечивает повышенную прочность компактного вещества. Между пластинками остеона залегают лакуны с остеонами. Канал остеона содержит один или два мелких кровеносных сосуда, окруженных небольшим количеством рыхлой волокнистой соединительной ткани. Каналы остеонов сообщаются друг с другом. По каналам кровь протекает в глубокие слои ткани и красный костный мозг. Наружной границей остеона (отделяющей его от соседних остеонов и вставочных пластинок) является цементная линия толщиной 1-2 мкм, образованная основным веществом (рис. 18).

Вставочные пластинки заполняют пространства между остеонами и являются остатками ранее существовавших остеонов, разрушенных в процессе перестройки кости.

Строение остеона во многом зависит от состояния минерального обмена. Так, у птиц во время линьки благодаря рассасыванию минеральных солей гаверсовы каналы увеличиваются, и тогда весь остеон превращается в гаверсов канал.

Внутренняя поверхность кости одета внутренней общей (генеральной) системой и представлена пластинками, ориентированными параллельно поверхности костно-мозгового канала. Внутри общая система костных пластинок граничит с эндоостом, аналогичным по строению с надкостницей.

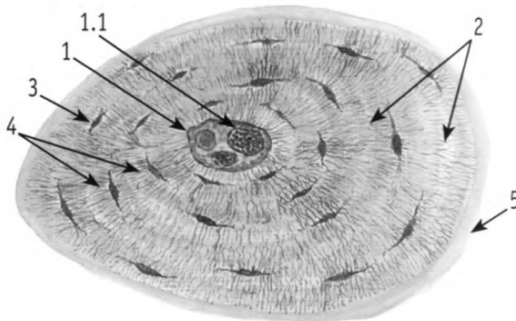


Рис. 18. Поперечный срез остеона:

- 1 – канал остеона: 1.1 – кровеносные сосуды; 2 – костные пластинки;*
- 3 – костная лакуна с телом остеоицита;*
- 4 – костные канальцы с отростками остеоицитов;*
- 5 – спайная (цементирующая) линия*

1.4. Мышечные ткани

Мышечные ткани обладают способностью возбуждения и сокращения. Сокращение сопровождается большой затратой энергии, образующейся при гидролизе АТФ, и осуществляется за счет специального сократительного аппарата.

Развиваются мышечные ткани из мезенхимы, миотомов сегментированной части мезодермы, висцерального листка спланхнотомы.

Морфофункциональная классификация выделяет поперечнополосатые и гладкие мышечные ткани.

1. Поперечнополосатые мышечные ткани образованы структурными элементами (клетками, волокнами), которые обладают поперечной исчерченностью, обусловленной упорядоченным взаиморасположением в них актиновых и миозиновых миофиламентов. К поперечнополосатым мышечным тканям относят скелетную (соматическую) и сердечную мышечные ткани.

2. Гладкие мышечные ткани состоят из клеток, не обладающих поперечной исчерченностью. Наиболее распространенным видом этих тканей является гладкая мышечная ткань, входящая в состав стенки различных органов.

1.4.1. Гладкая мышечная ткань

Гладкая мышечная ткань широко распространена в организме, она входит в состав стенки полых (трубкообразных) внутренних органов – бронхов, желудка, кишки, матки, маточных труб, мочеточников, мочевого пузыря, сосудов. Гладкая мышечная ткань встречается также в коже, где образует мышцы, поднимающие волос, в капсулах и трабекулах некоторых органов (селезенка, семенник). Сокращается медленно, ритмично, обеспечивает длительные тонические сокращения.

Гладкая мышечная ткань развивается из мезенхимы (рис. 19). Структурно-функциональной единицей является гладкий миоцит.

Гладкие миоциты – одноядерные клетки преимущественно веретеновидной формы и образующие многочисленные соединения друг с другом с помощью десмосом, плотных и щелевидных контактов, соединения типа интердигитации. Располагаются гладкие миоциты в пластах таким образом, что узкая часть одной клетки прилежит к широкой части другой. Это обеспечивает компактную укладку миоцитов и обеспечивает максимальную площадь их взаимных контактов, что способствует быстрому распространению нервного импульса.

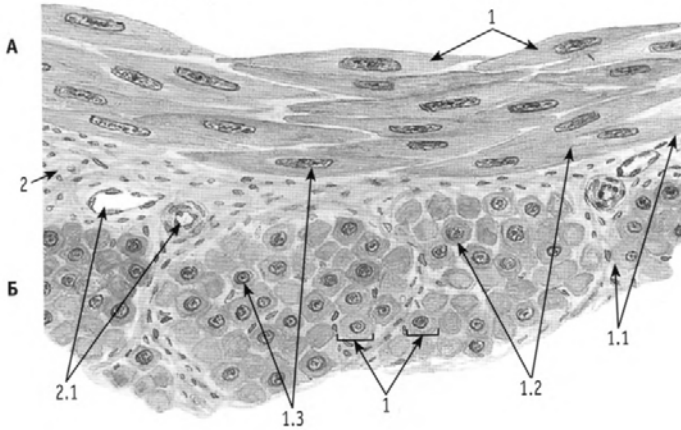


Рис. 19. Гладкая мышечная ткань:

А – продольный срез; Б – поперечный срез;

*1 – гладкие миоциты: 1.1 – сарколемма, 1.2 – саркоплазма,
1.3 – ядро; 2 – прослойки рыхлой волокнистой соединительной ткани
между пучками гладких миоцитов: 2.1 – кровеносные сосуды*

Длина клеток в состоянии расслабления – от 20 до 1000 мкм (в среднем около 200 мкм), их толщина – от 2 до 20 мкм. При резком сокращении длина миоцитов уменьшается до 20% от начальной. Гладкие миоциты окружены сарколеммой, которая снаружи покрыта базальной мембраной, содержат одно ядро и саркоплазму, в которой располагаются органеллы и включения.

Ядро сигарообразной формы расположено в центральной утолщенной части вдоль длинной оси клетки. При сокращении ядро образует складки и может штопорообразно закручиваться.

Саркоплазма содержит общие органеллы: митохондрии, аппарат Гольджи, центросому, ЭПС, включения гликогена, которые располагаются в конусовидных участках у полюсов ядра.

Сократительный аппарат гладких миоцитов представлен тонкими (актиновыми) и толстыми (миозиновыми) филаментами. Тонкие филаменты преобладают над толстыми по количеству и занимаемому объему (на один миозиновый филамент приходится не менее 12 актиновых). В расслабленном состоянии миофиламенты ориентированы продольно, а при сокращении образуют актиномиозиновый комплекс, приводящий к укорочению клетки.

Структурно-функциональными единицами являются пучки поперечно-полосатых мышечных волокон.

Мышечное волокно представляет собой цилиндрическое образование диаметром 10-100 мкм (в среднем 50 мкм), длиной до 10-30 см. Диаметр волокон зависит от принадлежности к определенной мышце, пола животного, возраста, питания, степени функциональной нагрузки (рис. 21).

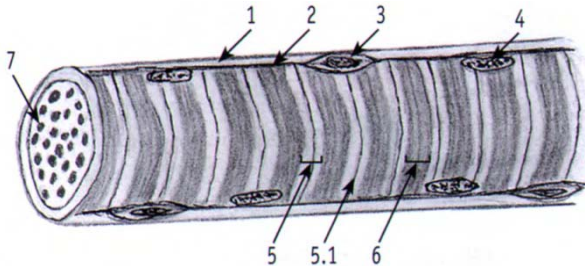


Рис. 21. Скелетное мышечное волокно (схема):

- 1 – базальная мембрана; 2 – сарколемма; 3 – миосателлитоцит;
 4 – ядро миосимпласта; 5 – изотропный диск; 5.1 – телофрагма;
 6 – анизотропный диск; 7 – поперечный срез миофибрилл

Оболочка волокна называется сарколеммой, а содержимое – саркоплазмой.

Внутри волокна под сарколеммой располагаются многочисленные ядра (до 100 ядер и более). Ядра сравнительно светлые, овальные, уплощенные длиной 10-20 мкм, с 1-2 ядрышками. Ориентированы длинной осью вдоль волокна и располагаются на расстоянии около 5 мкм друг от друга. При резком сокращении они могут укорачиваться, деформироваться и штопорообразно скручиваться.

Саркоплазма содержит все органеллы общего значения, за исключением центриолей.

Сократительный аппарат мышечного волокна представлен миофибриллами – специальными органеллами, которые заполняют центральную часть саркоплазмы и тянутся вдоль всей длины волокна.

Миофибриллы имеют вид нитей диаметром 1-2 мкм и длиной, сопоставимой с протяженностью волокна. Их количество в отдельном волокне – от нескольких десятков до 2000 и более. Они сформированы из упорядоченно расположенных белков актина и миозина. В световом микроскопе при проходящем свете белки по-разному преломляют

световые лучи. Миозин обладает двойным лучепреломлением и образует темные анизотропные диски (А), а актин пропускает свет и образует светлые изотропные диски (J), причем в мышечном волокне анизотропные и изотропные диски одних миофибрилл точно совпадают с аналогичными дисками других, обуславливая поперечную исчерченность всего волокна.

Структурной единицей миофибрилл является саркомер (рис. 22). Саркомер представляет собой участок миофибриллы, расположенный между двумя телофрагмами (Z-линиями) и включающий А-диск и две половинки J-дисков – по одной половине с каждой стороны. В расслабленной мышце длина саркомера составляет 2-3 мкм, а при сокращении мышцы саркомер укорачивается до 1,5 мкм.

Актиновые и миозиновые миофиламенты контактируют не конец в конец, а перемещаются по отношению друг к другу и в диске А образуют зону перекрытия. Участок А-диска, состоящий только из миозиновых миофиламентов, называется Н-линией и по сравнению с зоной перекрытия более светлый. Линия М – это место соединения толстых миозиновых миофиламентов в анизотропных дисках.

Линия Z состоит из Z-филаментов. В них выявлены белки пропомиозин – В, а – актин. Z-филаменты формируют решетку, к которой с обеих сторон прикреплены тонкие актиновые миофиламенты дисков J двух соседних саркомеров. Z-линия проходит через всю длину саркомера, а зона прикрепления актиновых тонких миофиламентов имеет зигзагообразный контур. Таким образом, линии Z и М являются опорным аппаратом саркомера.

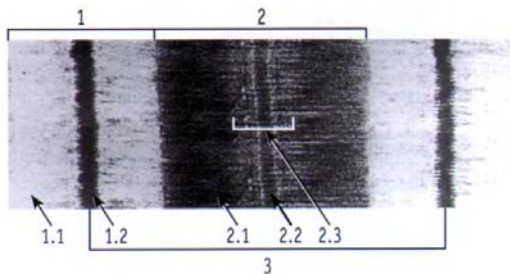


Рис. 22. Участок миофибриллы волокна скелетной мышечной ткани (саркомер): 1 – изотропный диск: 1.1 – тонкие (актиновые) миофиламенты, 1.2 – телофрагма; 2 – анизотропный диск: 2.1 – толстые (миозиновые) миофиламенты, 2.2 – мезофрагма, 2.3 – полоска Н; 3 – саркомер

Механизм мышечного сокращения происходит по принципу скользящих нитей, согласно которому укорочение каждого саркомера (а следовательно, миофибрилл и всего мышечного волокна) при сокращении происходит благодаря тому, что тонкие нити вдвигаются в промежутки между толстыми без изменения их длины.

В зоне перекрытия образуется актиномиозиновый комплекс. Здесь распадаются молекулы АТФ и освобождается энергия, необходимая для сокращения. При этом большую роль играют ионы кальция.

В саркоплазме мышечного волокна локализуются элементы гранулярной эндоплазматической сети, аппарат Гольджи, хорошо развиты митохондрии, которые скапливаются между фибриллами, вокруг ядер, вблизи сарколеммы. Интенсивно развита агранулярная эндоплазматическая сеть – система уплощенных, вытянутых и анастомозирующих мембранных трубочек и мешочков, которая окружает каждый саркомер миофибриллы наподобие муфты. В области наружных отделов А- и J-дисков трубочки сливаются, образуя пары плоских терминальных цистерн (на каждый саркомер приходится по две такие пары). В эндоплазматической сети депонируются ионы Ca^{2+} .

Сарколемма состоит из плазмолеммы и базальной мембраны, в которую вплетаются коллагеновые и эластические волокна, образующие внешний каркас волокна.

Плазмолемма через равные промежутки образует под прямым углом к оси волокна глубокие выпячивания в виде трубок, названных Т-трубочками.

Т-трубочки располагаются у млекопитающих вблизи границы J- и А-дисков. Ветви соседних Т-трубочек опоясывают каждый саркомер и анастомозируют друг с другом. Конечные участки Т-трубочек проникают в промежуток между терминальными цистернами эндоплазматической сети, формируя вместе с ними особые структуры – триады. Они играют главную роль в проведении нервного импульса и аккумуляции ионов кальция.

Энергия для работы мышечного волокна образуется из гликогена и миоглобина. Миоглобин связывает и депонирует кислород, поступающий в волокно, и отдает его при работе мышцы. Волокна, содержащие большое количество миоглобина, имеют красную окраску и называются красными. Волокна, в которых миоглобина меньше, отличаются более светлым цветом и называются белыми. Между этими типами имеются промежуточные формы.

Как правило, каждая мышца содержит белые, красные и промежуточные волокна.

Отдельные мышечные волокна объединяются в пучки I порядка прослойками рыхлой соединительной ткани (эндомизием). Пучки первого порядка объединяются соединительной тканью в пучки II порядка (перимизием). Пучки II порядка образуют пучок III порядка. Все вместе пучки формируют мышцу, одетую соединительнотканной оболочкой – эпимизием.

1.4.3. Сердечная мышечная ткань

Сердечная мышечная ткань встречается только в мышечной оболочке сердца (миокарде) и устьях крупных кровеносных сосудов, связанных с сердцем (рис. 23).

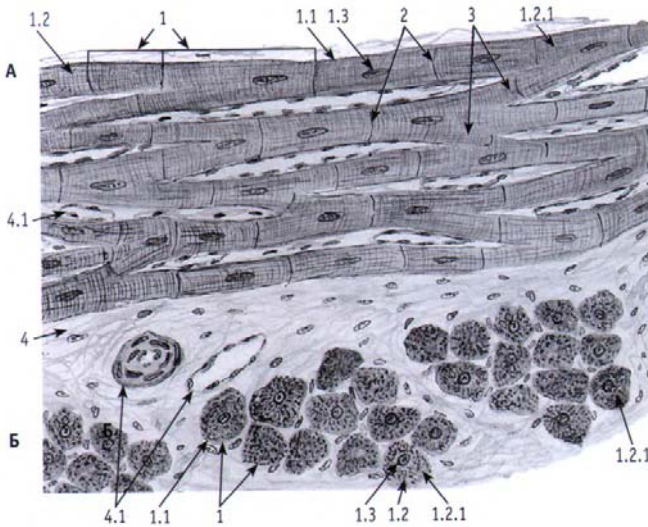


Рис. 23. Сердечная мышечная ткань:

А – продольный срез; Б – поперечный срез;

- 1 – кардиомиоциты (образуют волокна): 1.1 – сарколемма,
 1.2 – саркоплазма, 1.2.1 – миофибриллы, 1.3 – ядро; 2 – вставочные диски;
 3 – анастомозы между волокнами;
 4 – рыхлая волокнистая соединительная ткань: 4.1 – кровеносные сосуды

Основным функциональным свойством сердечной мышечной ткани является способность к спонтанным ритмическим сокращениям.

Сердечная мышечная ткань состоит из клеток – кардиомиоцитов, объединенных в сердечные волокна, которые соединяются друг с другом с помощью переходных мостиков и образуют трехмерную единую сеть. Между волокнами располагаются прослойки рыхлой соединительной ткани – эндомизий, в котором проходят сосуды и нервы.

Кардиомиоциты – цилиндрические или ветвящиеся клетки, более крупные в желудочках, где их длина составляет 100-150 мкм, а диаметр – 10-20 мкм. В предсердиях они обычно имеют неправильную форму и меньшие размеры (длина – 40-70 мкм, диаметр – 5-6 мкм).

Границы соседних миоцитов представлены в виде вставочных (темных) полосок, идущих поперек волокна. Вставочные пластинки осуществляют связь кардиомиоцитов друг с другом. Соседние кардиомиоциты в области вставочного диска образуют многочисленные интердигитации, связанные контактами типа десмосом и полосок слияния. Актиновые филаменты прикрепляются к поперечным участкам сарколеммы вставочного диска на уровне Z-полоски.

Кардиомиоциты содержат одно или два ядра и саркоплазму, покрыты сарколеммой, которая состоит из плазмолеммы и базальной мембраны. Ядра кардиомиоцитов – светлые, с преобладанием эухроматина с хорошо заметными ядрышками – располагаются в центре клетки. Саркоплазма кардиомиоцита богата миоглобином, митохондриями, гликогеном и имеет темно-красный цвет.

Сократительный аппарат сильно развит и занимает до 50-70% объема клетки, представлен миофибриллами, обладающими поперечной исчерченностью. Миофибриллы нередко сливаются друг с другом, образуя единую структуру. В саркоплазме кардиомиоцитов миофибриллы ориентированы продольно, располагаются по ее периферии, под сарколеммой.

Значительное место в саркоплазме занимает огромное количество митохондрий, которые лежат рядами между миофибриллами, у полюсов ядра и под сарколеммой. Наличие такого большого количества саркосом, по-видимому, обеспечивает способность сердца к непрерывной работе.

Эндоплазматическая сеть развита слабее, чем в скелетном мышечном волокне, менее активно накапливает ионы кальция, поэтому сердечная мышца нуждается в постоянном притоке кальция извне.

Поперечные Т-трубочки – широкие, содержат компоненты базальной мембраны, вместе с элементами эндоплазматической сети образуют диады (включают одну Т-трубочку и одну цистерну сети), ко-

торые располагаются в области Z-линий. Т-трубочки хорошо выражены в миоцитах желудочков и почти не обнаруживаются в предсердных миоцитах. Ионы кальция проникают в саркоплазму кардиомиоцитов не только из эндоплазматической сети, но также через Т-трубочки и сарколемму из межклеточного пространства.

Сердечная мышечная ткань содержит кардиомиоциты трех основных типов: 1) сократительные (рабочие); 2) проводящие; 3) секреторные (эндокринные).

Сократительные (рабочие) кардиомиоциты образуют большую часть миокарда и характеризуются хорошо развитым сократительным аппаратом.

Проводящие кардиомиоциты обладают способностью к генерации и быстрому проведению электрических импульсов. Они образуют узлы и пучки проводящей системы сердца. Характеризуются большим диаметром, слабым развитием сократительного аппарата, светлой саркоплазмой и крупными ядрами с малым количеством гетерохроматина.

Секреторные (эндокринные) кардиомиоциты располагаются в предсердиях, имеют отростчатую форму и слабо развитый сократительный аппарат. В их саркоплазме располагаются гранулы диаметром 200-300 нм, содержащие гормон – предсердный натриуретический фактор. Этот гормон вызывает усиленную потерю натрия и воды с мочой, расширение кровеносных сосудов, снижение артериального давления, угнетение секреции альдостерона, кортизола и вазопрессина.

1.5. Нервная ткань

Нервная ткань является высшей, наиболее совершенной формой организации живого вещества. Она образует нервную систему, которая воспринимает явления окружающего мира и обеспечивает реакцию на них организма, регулирует работу внутренних органов и обмен веществ.

Нервная ткань состоит из нейронов (нейроцитов), обладающих способностью к выработке и проведению нервных импульсов, и клеток нейроглии, выполняющих ряд вспомогательных функций (опорную, трофическую, барьерную, защитную и др.) и обеспечивающих деятельность нейронов.

Развивается нервная ткань, за исключением микроглии, из нервной пластинки, которая образуется в дорсальной части эктодермы.

Нейроны являются структурной и функциональной единицей нервной ткани. Нейрон состоит из клеточного тела – перикариона и отростков, обеспечивающих проведение нервных импульсов – дендритов, приносящих импульсы к телу нейрона, и аксона (нейрита), несущего импульс от тела нейрона (рис. 24).

Тело нейрона (перикарион) имеет различные размеры от 4-5 до 140 мкм, включает ядро и цитоплазму. Перикарион содержит синтетический аппарат нейрона, а его плазмолемма осуществляет рецепторные функции, так как на ней находятся многочисленные нервные окончания (синапсы), несущие различные сигналы (возбуждающие или тормозящие) от других нейронов.

Ядро в большинстве нейронов располагается в центре тела клетки. Как правило, ядро крупное, сферической формы, светлое, содержит мало хроматина. Ядрышко хорошо заметно, в одном ядре может быть два и более ядрышек.

В нейроплазме тела клетки и дендритов в световой микроскоп видны глыбки базофильного вещества. Они называются тельцами Ниссля, по имени немецкого невропатолога Франца Ниссля, который первый в конце XIX в. описал их. Крупные глыбки придают клетке отдаленное сходство с тигровой шкурой, поэтому вещество Ниссля нередко называют тигроидным.

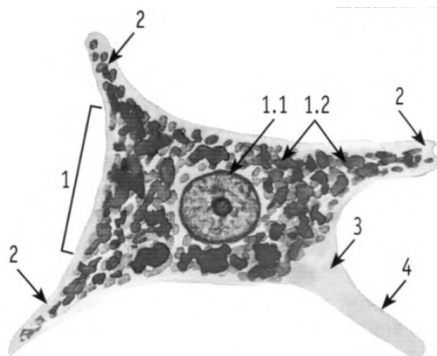


Рис. 24. Мультиполярный двигательный нейрон спинного мозга.

Глыбки хроматофильной субстанции (субстанции Ниссля) в цитоплазме:
 1 – тело нейрона (перикарион): 1.1 – ядро, 1.2 – хроматофильная субстанция;
 2 – начальные отделы дендритов; 3 – аксональный холмик; 4 – аксон

В электронный микроскоп видно, что вещество Ниссля представляет собой гранулярную эндоплазматическую сеть, содержащую многочисленные свободные и прикрепленные рибосомы и полисомы. Обилие р-РНК обуславливает базофилию телец Ниссля, видимую в световой микроскоп. При интенсивной работе количество базофильного вещества уменьшается, а во время отдыха восстанавливается.

Аппарат Гольджи хорошо развит (впервые описан в нейронах), располагается обычно вокруг ядра. Митохондрии очень многочисленны, имеют палочковидную форму и характеризуются быстрым изнашиванием и обновлением (коротким жизненным циклом). Большое количество митохондрий обеспечивает высокие энергетические потребности нейрона, связанные с активностью синтетических процессов, проведением нервных импульсов.

Лизосомальный аппарат (аппарат внутриклеточного пищеварения) представлен эндосомами и лизосомами различных размеров, которые обеспечивают постоянное обновление компонентов цитоплазмы нейрона.

Цитоскелет нейрона хорошо развит и представлен микротрубочками (нейротрубочками), микрофиламентами и промежуточными филаментами (нейрофиламентами). Они образуют трехмерную опорно-сократительную сеть, поддерживающую форму нейрона, особенно его отростков.

Нейрофиламенты при окрашивании солями серебра склеиваются в пучки, видимые в световой микроскоп в виде нейрофибрилл – нитей толщиной 0,5-3 мкм, образующих сеть в перикарионе. Такие образования фактически являются артефактами. Клеточный центр присутствует во всех нейронах, его главная функция – сборка микротрубочек.

В цитоплазме нейрона содержатся включения – гранулы липофусцина (пигмента старения или изнашивания), которые не могут быть удалены путем лизосомного переваривания и накапливаются в остаточных тельцах в течение жизни.

Отростки нейронов по функциональному значению делятся на два вида: аксон и дендриты.

Аксон (нейрит) – длинный (до 1,5 м) маловетвящийся отросток, по которому импульсы передаются на другие нейроны или клетки рабочих органов (мышц, желез). Нейроны имеют всегда один аксон. Аксон отходит от утолщенного участка тела нейрона, не содержащего базофильного вещества – аксонального холмика, в котором генерируются нервные импульсы.

Дендриты проводят импульсы к телу нейрона, получая сигналы от других нейронов через многочисленные межнейрональные контакты (аксо-дендритические синапсы). Эти отростки значительно короче аксона и сильно разветвляются наподобие дерева вблизи тела нейрона.

Плазмолемма нейрона специально приспособлена для образования и передачи нервных импульсов. Если удалить из отростка нервной клетки все его содержимое, заменить его раствором калийной соли, то плазмолемма еще сохранит на некоторое время способность к нервному проведению.

По количеству отростков нейроны подразделяются на три типа: униполярные, биполярные и мультиполярные.

1. *Униполярные нейроны* имеют один отросток – аксон, передающий нервный импульс на другую нервную клетку. В организме млекопитающих животных униполярную форму имеют лишь нейробласты до периода образования дендритов. Некоторые авторы к таким клеткам все же относят амакринные нейроны сетчатки глаза и межклубочковые нейроны обонятельной луковицы.

2. *Биполярные нейроны* имеют два отростка – аксон и дендрит, обычно отходящие от противоположных полюсов клетки. У млекопитающих они характерны для органов чувств: сетчатки глаза, спирального ганглия внутреннего уха и др. К биполярным нейронам относят и «псевдоуниполярные» клетки спинномозговых узлов. От тела «псевдоуниполярного» нейрона отходит тяж цитоплазмы, имеющей форму отростка, который Т-образно, на некотором расстоянии от клетки, делится на дендрит и аксон.

3. *Мультиполярные нейроны* имеют три или большее число отростков: аксон и несколько дендритов. Они могут быть разнообразной формы: веретеновидные, звездчатые, пирамидные, корзинчатые и др. По длине аксона выделяют клетки Гольджи I типа (с длинным аксоном) и клетки Гольджи II типа (с коротким аксоном).

По характеру выполняемой функции нейроны разделяются на три типа: чувствительные, двигательные и ассоциативные.

1. *Чувствительные (афферентные) нейроны* генерируют нервные импульсы под влиянием изменений внешней или внутренней среды и передают его на двигательный (эфферентный) нейрон.

2. *Двигательные (эфферентные) нейроны* передают сигналы на рабочие органы.

3. *Ассоциативные (вставочные) нейроны* осуществляют связи между чувствительными и двигательными нейронами в составе реф-

лекторных дуг и составляют в нервной системе около 99,98% от общего числа нервных клеток.

Нейроглия – комплекс клеточных элементов, выполняющих в нервной ткани опорную, трофическую, разграничительную, барьерную, секреторную и защитную функции.

Нейроглия включает макроглию и микроглию. Макроглия подразделяется на астроцитарную глию (астроглию), олигодендроглию и эпиндимную глию.

Астроглия представлена астроцитами – самыми крупными глиальными клетками с крупным овальным ядром и расходящимися в разные стороны отростками.

Астроциты подразделяются на две группы: а) плазматические, располагающиеся преимущественно в сером веществе ЦНС, для них характерно наличие многочисленных разветвленных коротких толстых отростков; б) волокнистые астроциты, находящиеся в основном в белом веществе ЦНС. От их тел отходят длинные тонкие, незначительно ветвящиеся отростки.

Оба вида астроцитов выполняют опорную, разграничительную, транспортную и барьерную функции. Наиболее важной функцией астроцитов считается метаболическая и регуляторная, которая направлена на поддержание определенной концентрации ионов (K^+) и медиаторов в микроокружении нейронов. Астроциты обладают выраженной фагоцитарной активностью и участвуют в различных защитных реакциях.

Эпендимная глия, или эпендима – образована клетками кубической или цилиндрической формы (эпендимоцитами), образующими однослойные пласты, которые выстилают полости желудочков головного мозга и центрального канала спинного мозга. Обращенные в просвет полостей и каналов концы клеток имеют мерцательные реснички, обеспечивающие ток спинномозговой жидкости. От противоположных концов этих клеток отходят отростки, которые пронизывают все вещество мозга и играют опорную роль. В некоторых эпендимоцитах обнаруживаются секреторные гранулы. Предполагают, что эпендимоциты выделяют секрет в цереброспинальную жидкость и регулируют ее состав.

Олигодендроглия состоит из клеток – олигодендроцитов с короткими немногочисленными отростками, которые окружают тела нейронов, входят в состав нервных волокон и нервных окончаний. Олигодендроциты имеют самые разнообразные формы и размеры. Они играют большую роль в трофике нейрона и нервного волокна. Предполагается, что глиальные клетки контактируют с кровеносными ка-

пиллярами, перерабатывают получаемые ими вещества и передают нейронам уже готовые высокомолекулярные вещества. Клетки олигодендроглии, входящие в состав нервных окончаний, играют немаловажную роль в восприятии и проведении нервного импульса.

Микроглия развивается из мезенхимы, состоит из мелких, удлиненных звездчатых клеток – микроглиоцитов, которые происходят непосредственно из моноцитов и располагаются преимущественно вдоль капилляров в ЦНС, способны к фагоцитозу и выполняют защитную функцию в нервной ткани.

Отростки нервных клеток в совокупности с покрывающими их клетками нейроглии образуют нервные волокна. Различают два вида нервных волокон – миелиновые и безмиелиновые. Оба вида состоят из центрально лежащего отростка нейрона (осевого цилиндра), окруженного оболочкой из клеток олигодендроглии – нейролеммоцитами (леммоцитами, шванновскими клетками).

Безмиелиновые нервные волокна располагаются преимущественно в составе вегетативной нервной системы и характеризуются сравнительно низкой скоростью проведения нервных импульсов (0,5-2 м/с). Они образуются путем погружения осевого цилиндра (аксона) в цитоплазму леммоцитов, располагающихся в виде тяжа. При этом плазмолемма леммоцита прогибается, окружая аксон, и образует сдвоенную мембрану – мезаксон, на которой подвешен осевой цилиндр. Нередко в цитоплазме одного леммоцита могут находиться до 10-20 осевых цилиндров. Такое волокно напоминает электрический кабель и поэтому называется волокном кабельного типа. Поверхность волокна покрыта базальной мембраной.

Миелиновые нервные волокна встречаются в ЦНС и ПНС и характеризуются высокой скоростью проведения нервных импульсов (5-120 м/с). В миелиновом волокне осевой цилиндр окружен особой миелиновой оболочкой, вокруг которой располагается тонкий слой, включающий цитоплазму и ядро леммоцита – неврилемма (рис. 25).

Миелиновая оболочка и неврилемма – составные части леммоцитов, окружающих осевой цилиндр. Снаружи волокно также покрыто базальной мембраной.

При образовании миелинового волокна осевой цилиндр погружается в леммоцит и формируется мезаксон, который вращается вокруг отростка нейрона. По мере увеличения числа витков (пластин) они располагаются все более плотно и частично сливаются, формируя миелиновую оболочку. Из накрученного участка леммоцита цито-

плазма выдавливается в свободные участки миелина и формирует миелиновые насечки. Миелиновая оболочка содержит высокие концентрации липидов и интенсивно окрашивается осмиевой кислотой.

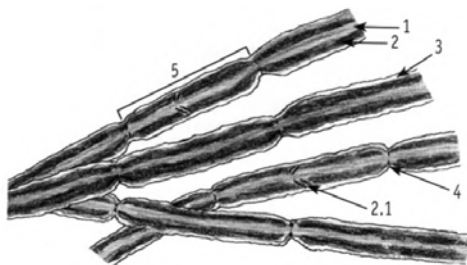


Рис. 25. Изолированные миелиновые нервные волокна:
 1 – нейронный отросток (осевой цилиндр); 2 – миелиновая оболочка:
 2.1 – насечки миелина; 3 – нейролемма; 4 – узловой перехват
 нервного волокна (перехват Ранвье); 5 – межузловой сегмент

Леммоциты в волокне располагаются поочередно, соединяясь друг с другом пальцеобразными выростами (интердигитацией). В области границы соседних леммоцитов миелиновая оболочка отсутствует, волокно истончается, образуя сужение – узловой перехват. Узловые перехваты повторяются по ходу волокна в среднем через 1-2 мм. Участки между двумя перехватами называются межузловыми сегментами.

На основании в различии скорости проведения импульсов выделяют три основных типа волокон:

1. *Волокна типа А* – толстые, миелиновые, с далеко отстоящими узловыми перехватами; проводят импульсы с высокой скоростью (15-120 м/с).

2. *Волокна типа В* – средней толщины, миелиновые, меньшего диаметра, чем волокна типа А, с более тонкой миелиновой оболочкой и более низкой скоростью проведения нервных импульсов (5-15 м/с).

3. *Волокна типа С* – тонкие, безмиелиновые, проводят импульсы со сравнительно малой скоростью (0,5-2 м/с).

Нервные волокна – концевые аппараты нервного волокна. По функции они разделяются на три группы: межнейронные контакты (синапсы), эфферентные окончания и рецепторные.

Межнейронные контакты (синапсы) – специализированные контакты двух нейронов, обеспечивающие одностороннее проведение нервного возбуждения. Встречаются синапсы с химической и элек-

трической передачей. Электрические синапсы у млекопитающих встречаются редко.

В зависимости от того, какие участки нейронов вступают в контакт, различают аксодендритические (аксон одного нейрона контактирует с дендритом другого нейрона), аксоматические (аксон контактирует с телом другого нейрона) и аксональные (контактируют аксоны двух нейронов) синапсы.

Морфологически в синапсе различают пресинаптический полюс – концевой отдел первого нейрона, постсинаптический полюс – участок второго нейрона, воспринимающий импульс. Между двумя полюсами находится узкая синаптическая щель.

В пресинаптической части содержится медиатор (ацетилхолин или норадреналин), который под влиянием нервного импульса выделяется в синаптическую щель и, связываясь с рецепторами в постсинаптической части, вызывает изменение ионной проницаемости ее мембраны, что приводит к ее деполяризации (в возбуждающих синапсах) или гиперполяризации (в тормозных синапсах).

Эфektorные нервные окончания передают сигналы из нервной системы на исполнительные органы и подразделяются на двигательные (имеются в поперечно-полосатых и гладких мышцах) и секреторные (в железах).

Двигательные нервные окончания поперечно-полосатых мышц – моторные бляшки – состоят из концевого ветвления аксона, образующего пресинаптическую часть, специализированного участка на мышечном волокне, соответствующего постсинаптической части, и разделяющей их синаптической щели.

Вблизи мышечного волокна аксон утрачивает миелиновую оболочку и дает несколько веточек, которые сверху покрыты уплощенными леммоцитами и базальной мембраной. В терминалях аксона располагается много митохондрий и синаптических пузырьков, содержащих медиатор – ацетилхолин, который при деполяризации плазмолеммы аксона – пресинаптической мембраны – поступает в синаптическую щель и на холинорецепторы постсинаптической мембраны, представленной мембраной мышечного волокна (сарколеммой), что вызывает возбуждение (волну деполяризации постсинаптической мембраны). В области нервно-мышечного окончания сарколемма образует многочисленные складки (вторичные синаптические щели), которые увеличивают общую площадь щели: в сарколемме содержатся многочисленные митохондрии, цистерны гранулярной эндоплазма-

тической сети, рибосомы, скопление ядер и отсутствует поперечная исчерченность.

Двигательные нервные окончания в сердечной и гладких мышцах имеют вид четкообразных расширений, которые содержат многочисленные синаптические пузырьки и митохондрии.

Секреторные нервные окончания образованы концевыми участками тонких аксональных веточек. Одни из них, утрачивая миелиновую оболочку, проникают сквозь базальную мембрану и располагаются между секреторными клетками, заканчиваясь варикозными расширениями, содержащими пузырьки и митохондрии, другие не проникают через базальную мембрану и образуют варикозные расширения вблизи секреторных клеток.

Рецепторные (чувствительные) нервные окончания воспринимают сигналы из внешней среды (экстерорецепторы) и внутренних органов (интерорецепторы). В зависимости от природы раздражения, регистрируемого рецепторами, они подразделяются на механорецепторы, хеморецепторы, терморецепторы и болевые рецепторы. В зависимости от структурной организации различают свободные и несвободные чувствительные нервные окончания.

Свободные чувствительные нервные окончания состоят только из терминальных ветвей дендрита чувствительного нейрона. Эти окончания встречаются в эпителии и соединительной ткани. Несвободные чувствительные окончания содержат все компоненты нервного волокна и подразделяются на инкапсулированные и неинкапсулированные.

Несвободные неинкапсулированные нервные окончания состоят из ветвлений дендритов, окруженных леммоцитами. Такие окончания встречаются в дерме кожи и собственных пластинках слизистых оболочек. Несвободные инкапсулированные нервные окончания образованы ветвлением дендрита, окруженного леммоцитами, и снаружи покрытым особой соединительнотканной капсулой.

Инкапсулированные рецепторы различаются характером ветвления осевого цилиндра, количеством и положением пластинок во внутренней колбе и капсуле. Особенности строения определяют характер чувствительности нервного окончания. К этому виду нервных окончаний относятся пластинчатые тельца (Фатер-Пачини), осязательные тельца (Мейснера), тельца Руффини, колбы Краузе, нервно-мышечные веретена и нервно-сухожильные веретена (сухожильные органы Гольджи).

В поперечно-полосатой мышечной ткани разветвление осевого цилиндра оплетает сверху группу видоизмененных мышечных воло-

кон и образует подобие веретена. Сверху нервно-мышечное волокно покрыто соединительнотканной капсулой. Нервно-мышечные веретена обладают как чувствительной, так и двигательной иннервацией.

2. ОСНОВЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Изготовление гистологических препаратов – сложный и довольно трудоёмкий процесс, требующий знания не только последовательности выполнения работы и определённых навыков, но и правил подготовки и работы с материалом.

Самая простая схема изготовления гистопрепаратов, посильная студентам и магистрантам, выполняющим исследовательские работы в областях морфологии, морфофизиологии, зоотехнии и ветеринарии, включает определённые этапы. Исследователь должен знать правила взятия материала и его фиксации, способ обезвоживания и заливки, технику приготовления гистологических срезов, общие принципы и методы окрашивания гистопрепаратов.

2.1. Взятие и фиксация материала

Важнейшими условиями получения высококачественных гистологических препаратов являются правильное взятие материала, минимальное травмирование ткани и соответствующая фиксация.

2.1.1. Техника вырезки материала

Оптимальная площадь кусочков ткани – 2-3 см,² толщина – 5-7 мм. Вырезанные кусочки ткани непосредственно с лезвия ножа погружают в фиксатор. Недопустимы сдавливание кусочков, промывание их водой, а также очистка поверхности органа. После погружения кусочков в сосуд с фиксатором туда же опускают этикетку с номером (шифром), написанным карандашом или тушью на матовой поверхности фотобумаги. В тех случаях, когда возникает необходимость маркировки каждого кусочка, его вместе с этикеткой завязывают в марлевый мешочек. Возможно также нанизывание кусочков на нитку: сначала 2-3 раза прошивают этикетку первого кусочка, затем сам кусочек, потом следующую этикетку и так далее до 10-15 кусочков.

2.1.2. Общие принципы фиксации

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов.

Фиксация всегда приводит к большим или меньшим изменениям структуры и объема ткани, степень выраженности которых зависит от рН фиксатора, его концентрации, температуры, продолжительности воздействия и других факторов. Концентрация ионов водорода фиксатора должна соответствовать таковой в тканях, поэтому фиксатор должен иметь рН, близкий к нейтральному. Увеличение температуры фиксатора ускоряет процесс, но вызывает еще большие изменения в тканях. Слишком продолжительная фиксация приводит к значительному уплотнению материала, что в дальнейшем затрудняет его обработку. Для каждого конкретного вида исследования подбирают наиболее приемлемый фиксатор.

Объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 10-20 раз, так как тканевая жидкость может существенно изменить концентрацию фиксатора.

В том случае, если цвет фиксатора изменяется после погружения в него кусочков ткани, фиксатор необходимо немедленно сменить.

Недопустимо повторное использование фиксаторов.

Для каждого фиксатора следует соблюдать установленное время фиксации. Длительное пребывание материала возможно лишь в некоторых фиксаторах, например 10%-ном нейтральном формалине, жидкости Буэна.

2.1.3. Фиксирующие жидкости

Различают простые и сложные фиксирующие жидкости. К **простым** относятся: формалин, этиловый спирт, ацетон.

Формалин. Основным широко применяемым фиксатором служит формалин, представляющий собой 40%-ный раствор формальдегида. Из него готовят нейтральный (забуференный до рН 7,0) 10-12%-ный формалин. Для этого в банку с 40%-ным формалином засыпают карбонат кальция или магния либо смесь этих солей – доломит из расчета 100 г на 1 л формалина. Для получения 10%-ного нейтрального формалина через 24 ч к 1 части 40%-ного нейтрального формалина добавляют 9 частей водопроводной воды.

Продолжительность фиксации составляет 24-48 ч при 20°C.

Универсальным фиксатором, пригодным для гистологических и большинства гистохимических исследований, является нейтральный формалин по Лилли: А + Б + В.

А. 100 мл 40%-ного формалина + 900 мл дистиллированной воды.

Б. 4 г дигидроортофосфата натрия моногидрата (однозамещенного фосфата натрия).

В. 6,5 г гидроортофосфата натрия (двухзамещенного фосфата натрия).

Этиловый спирт (этанол) (80, 90, 96 и 100%).

Его применяют в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку.

Продолжительность фиксации – от 2 ч до 1 сут. Увеличение длительности фиксации, особенно в 100%-ном спирте, нежелательно, так как материал значительно уплотняется и происходит его пересушивание.

Ацетон (его действие подобно действию спирта) используют для увеличения скорости фиксации. Применяют 100%-ный ацетон, для получения которого в коммерческий ацетон засыпают прокаленный сульфат меди (медный купорос) или силикагель. В ацетоне фиксируют кусочки толщиной 3-4 мм в течение 2 ч при 20°C или 30 мин. – 1 ч в термостате при 60°C в плотно закрытой посуде.

Составными частями **сложных** фиксаторов являются простые. Существует множество вариантов фиксирующих смесей. Наиболее распространенные следующие:

Спирт-формол по Шафферу – 10%-ный нейтральный формалин, который готовят из 1 части нейтрального 40%-ного формалина и 2-3 частей 96%-ного спирта.

Продолжительность фиксации составляет 24-48 ч. Дальнейшая промывка в воде не требуется, и материал сразу же помещают в 96%-ный спирт.

Солевой формол

Нейтральный 40%-ный формалин 100 мл

Хлорид натрия 8,5 г

Водопроводная вода 900 мл.

Продолжительность фиксации – 48 ч при 20°C с последующей промывкой в проточной воде в течение 6-12 ч.

Жидкость Буэна – классический фиксатор для экспериментальных исследований.

<i>Насыщенный раствор пикриновой кислоты</i>	<i>75 мл</i>
<i>Нейтральный 40%-ный формалин</i>	<i>25 мл</i>
<i>Ледяная уксусная кислота</i>	<i>5 мл</i>

Продолжительность фиксации – 1-24 ч при 20°C.

Насыщенный раствор пикриновой кислоты готовят заранее из расчета 3 г кристаллической пикриновой кислоты на 1 л горячей дистиллированной воды. После фиксации кусочки отмывают от избытка пикриновой кислоты в 70%-ном спирте, затем заливают в парафин.

Кальций-формол по Бейкеру используют для фиксации липидов: А + Б смешивают.

А. 10 мл 40%-ного формалина + 90 мл дистиллированной воды.

Б. 1 г хлорида кальция.

Растворы А и Б смешивают.

Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20°C.

Жидкость Карнуа – универсальный фиксатор для большинства гистологических и гистохимических исследований (кроме выявления липидов).

<i>Спирт 100-или 96%-ный</i>	<i>60 мл</i>
<i>Хлороформ</i>	<i>30 мл</i>
<i>Ледяная уксусная кислота</i>	<i>10 мл</i>

Продолжительность фиксации – 2-4 ч при 4°C или 1-2 ч при 20°C. Затем материал помещают в 100%-ный спирт. Если материал не сразу подлежит проводке, то его можно перенести в 96%-ный спирт и держать в нем до 3 сут.

2.1.4. Правила работы с фиксаторами

Практически все фиксаторы относятся к токсичным веществам, а некоторые ядовиты, поэтому фиксацию и вырезку материала необходимо производить в вытяжном шкафу. Материал, извлеченный из фиксатора, содержащего формалин, желательно в течение нескольких минут промыть в проточной воде, так как пары формалина оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и органов дыхания.

2.2. Обезвоживание и заливка материала

После фиксации, для которой применялся формалин, кусочки промывают в течение 6, 12 или 24 ч в проточной воде.

В том случае, если в состав фиксатора входила пикриновая кислота, материал следует промыть в нескольких сменах 70%-ного спирта, после фиксации с использованием сулемы – в йодированном 70%-ном спирте.

В случае необходимости кусочки тканей перед обезвоживанием можно уменьшить, подровнять. Если материал после фиксации не сразу подлежит проводке, то его можно оставить в 70-80%-ном спирте.

2.2.1. Способы обезвоживания тканей

Перед заливкой материала в парафин или целлоидин его необходимо обезвоживать. Существует несколько традиционных способов обезвоживания. Самым распространенным является обезвоживание в спиртах восходящей концентрации начиная с 70%-ного. Обычно применяют батарею спиртов, состоящую из двух порций 96%-ного и двух – 100%-ного спирта. Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах – в среднем 48 ч в зависимости от качества материала (содержания жира в ткани) и размера кусочков, а также от их количества.

2.2.2. Заливочные среды

Для получения тонких (до 6 мкм) гистологических срезов необходимо фиксированный и промытый материал залить в плотную среду, предварительно пропитав ею кусочки тканей. В зависимости от способа растворения все заливочные среды разделяют на растворимые в органических растворителях и водорастворимые. К первым относятся парафин, пластические полимеры на основе парафина, целлоидин, ко вторым – желатин, полиэтиленгликоли, полиэферы, некоторые метакрилаты и т.д.

2.2.3. Заливка ткани в парафин

Парафин – смесь высокомолекулярных предельных углеводородов, продукт перегонки нефти; растворяется в анилине, бензоле, бергамотном масле, целлозольве, хлороформе, декалине, диоксане, бутаноле, пропаноле, толуоле, трихлорэтилене, ксилоле. Каждый из этих растворителей можно использовать в качестве промежуточной среды между спиртом и парафином. Температура плавления различных парафинов – от 27 до 62°C. В гистологической технике применяют парафин с температурой плавления 56°C. Зарубежные фирмы производят специальный парафин для гистологических исследований, содержащий различные пластические полимеры, такие как диметилсуль-

фоксид. Их коммерческие названия – «Парапласт», «Парапласт плюс», «Гистопласт С», «Гистозес».

Важнейшим условием успешной заливки материала является своевременная смена реактивов в процессе их загрязнения, соблюдение рекомендуемых временных и температурных параметров. Также нужно стремиться к тому, чтобы одновременно заливать одинаковые по толщине и плотности кусочки ткани.

Схема Меркулова

Фиксация:

формалин 10%	24 ч
спирт-формол	24 ч
жидкость Карнуа	2-4 ч
спирт 96-100%	12-24 ч
промывание в проточной воде	12-24 ч

Обезвоживание:

спирт 96% (I)	24 ч
спирт 96% (II)	2 ч
спирт 100% (I)	24 ч
спирт 100% (II)	2 ч

Заливка в парафин:

Спирт + хлороформ (1:1)	6-12 ч
или спирт + ксилол (1:1)	1-3 ч
или хлороформ	6-12 ч
или ксилол	1-6 ч
хлороформ + парафин (1:1 – «каша») 37°C	2-3 ч
или ксилол + парафин (1:1 – «каша») 37°C	1-2 ч
парафин I 56°C	2 ч
парафин II 56°C	1 ч

Схема Волковой – Елецкого

Обезвоживание

спирт 50%	2-4 ч
спирт 60%	2-4 ч
спирт 70%	12-24 ч
спирт 96% (I)	12 ч
спирт 96% (II)	12 ч
спирт 100% (I)	1-12 ч
спирт 100% (II)	12 ч

Заливка в парафин:

спирт 100% + хлороформ (1:1)	2-3 ч
хлороформ I	1,5 ч
хлороформ II	0,5 ч
хлороформ III	0,5 ч
хлороформ + парафин (1:1) 37°C	3-6 ч
хлороформ + парафин (1:1) 56°C	0,5-1 ч
парафин I 56°C	2 ч
парафин II 56°C	2 ч
парафин III 56°C	1 ч

Приготовление парафиновых блоков

Пропитанные парафином кусочки ткани выкладывают в специальные формочки и заливают расплавленным в термостате или на водяной бане при 60°C парафином, в который добавлено 1-3 % воска.

Раскладывание кусочков в формочки и их ориентирование нужно проводить быстро теплым пинцетом. Если материала для заливки много и он быстро остывает, то можно использовать парафин, подогретый на водяной бане до 60°C. Для охлаждения формочки с материалом рекомендуют помещать в воду при 10-18°C, но не погружать в нее.

2.2.4. Заливка ткани в целлоидин-парафин

Этот метод рекомендуется для обработки объектов, которые легко сжимаются при парафиновой заливке, например, органов кровотока, мезенхимной ткани, а также органов и тканей, имеющих многослойное строение (трахея, кожа и др.).

<u>Фиксация</u> в 10%-ном формалине	24 ч
<u>Промывание</u> в проточной воде	6-12 ч
<u>Обезвоживание</u> в спиртах	2-3 дня
Спирт 100%-ный + эфир (1:1)	3-6 ч
Целлоидин 2%-ный	1-2 дня
Хлороформ	6-18 ч
Хлороформ + парафин (1:1) при 37°C	2-3 ч
Парафин I при 56°C	1-2 ч
Парафин II при 56°C	1-2 ч

Используют также смесь целлоидина с касторовым маслом (1:1), пребывание в которой объектов в течение 1-2 дней улучшает их пропитывание. Затем для удаления касторового масла материал промывают в трех порциях хлороформа.

2.2.5. Заливка ткани в желатин

Для исследования липидов в рыхлых тканях и органах, а также при изучении эмбриональных объектов с успехом применяют заливку в водорастворимый биополимер желатин. Используют кристаллический прозрачный пищевой желатин, из которого готовят 25- и 12,5%-ные растворы.

К 25 г желатина добавляют 75 мл 1%-ного водного раствора фенола (карболовая вода) и помещают в термостат при 37°C. Желатин набухает, и после перемешивания образуется густой 25%-ный раствор. Из него при разбавлении теплой (37°C) карболовой водой в 2 раза получают 12,5%-ный раствор желатина.

Приготовленные растворы разливают в чистые сухие пробирки для однократного использования и закрывают пробкой. В застывшем состоянии желатин можно долго хранить в темном прохладном месте.

Схема заливки в желатин по Волковой-Елецкому

Фиксация в 10%-ном формалине	24-48 ч
Промывание в проточной воде	18-24 ч
Желатин 12,5%-ный при 37°C (в закрытой посуде)	3-20 ч
(в зависимости от величины объекта)	
Желатин 25%-ный при 37°C	3-20 ч
Заливка свежим 25%-ным желатином в формочки, застывание в формочках в холодильнике	
Формалин 20-25%-ный (уплотнение блоков)	24 ч
Формалин 10%-ный	хранение.

Залитый в желатин материал режут на замораживающем микротоме. Из полученных срезов удаляют желатин, чтобы избежать окрашивания фона. Для этого срезы помещают на 30 мин. в 10%-ный раствор гидроксида калия при 37°C. Затем их промывают в водопроводной воде и окрашивают. Окрашенные срезы заключают в поливиниловый спирт или глицерин-желатин.

Приготовление поливинилового спирта: порошок поливинилового спирта отмывают в 96%-ном спирте (2 смены), эфире (3 смены) и высушивают. К 16 г отмытого порошка добавляют 100 мл дистиллированной воды, оставляют на 12 ч для набухания. Полученную массу нагревают в течение 20-30 мин. на кипящей водяной бане. На поверхности густой мутноватой жидкости образуется пленка с пузырьками, которую удаляют, а раствор фильтруют через 4 слоя марли. Поливиниловый спирт можно использовать как промежуточную среду для получения постоянных препаратов после резки на замораживаю-

щем микротоме. Сначала на срез, расправленный на стекле, наносят поливиниловый спирт, затем после образования тонкой пленки (через 6-12 ч) препарат заключают в полистирол или бальзам.

Приготовление глицерин-желатина: к 7 г желатина добавляют 41 мл дистиллированной воды и оставляют для набухания 3-4 ч. Затем добавляют 50 мл глицерина и 1 г фенола. Смесь нагревают на водяной бане, постоянно помешивая. Раствор фильтруют через крупнопористый фильтр, разливают по пробиркам, закрывают пробками и хранят в холодильнике.

Срезы ткани, залитой в желатин, полученные на замораживающем микротоме, можно обезводить в спиртах, просветлить в карбол-силоле и заключить в бальзам или полистирол.

В других схемах рекомендуют иные концентрации желатина и продолжительность пребывания в нем объектов.

2.3. Приготовление гистологических срезов

2.3.1. Микротомы и особенности работы на них

Микротомы – это приборы, с помощью которых получают срезы тканей, залитых в различные среды, а также замороженных и нефиксированных. Для получения гистологических срезов применяют специальные микротомные ножи, различающиеся по форме, длине и углу сечения лезвия. По форме они представляют собой сложный стальной клин, у которого режущий край имеет дополнительную клиновидную заточку. Длина ножа может составлять от 8 до 50 см.

Микротомы позволяют получать гистологические срезы различной толщины. По принципу действия различают санные, ротационные, замораживающие микротомы, а также криостаты и вибраторы.

Санные микротомы характеризуются горизонтальным движением ножа и вертикальным подъемом блокодержателя. Их с успехом используют для резки объектов, залитых в целлоидин, целлоидин-парафин и парафин.

Ротационные микротомы предназначены для резки парафиновых блоков, с их помощью можно получать серийные срезы.

Замораживающие микротомы используют для резки не залитых, но фиксированных объектов, материала, залитого в желатин и водорастворимые пластмассы.

Криостаты, вибраторы. С развитием гистохимии ферментов и иммуноморфологии возникла необходимость в обработке нефиксирован-

ного материала, которая была реализована с помощью специальных приборов – криостатов. Позднее появились криокиты и вибраторы.

Криостат – специализированная холодильная камера с установленным в ней микротомом, в которой имеются отверстия для рук, люминесцентная лампа и смотровое стекло.

Уход за микротомами и микротомными ножами.

Все скользящие поверхности микротомов должны быть чистыми и смазаны тонким слоем машинного или вазелинового масла. При постоянной работе на микротоме все скользящие поверхности необходимо один раз в неделю протирать тряпочкой, смоченной бензином или толуолом, и смазывать. После окончания работы на микротоме объектодержатель и станину очищают от остатков парафина, предварительно вынув микротомный нож и убрав его в футляр. Микротомные ножи никогда не оставляют в микротоме или на рабочем столе! Замораживающие микротомы и криостаты через 30 мин. после выключения вытирают насухо и винтовую подачу смазывают вазелиновым маслом.

2.3.2. Особенности работы на санном микротоме

Парафиновый блок, наклеенный на деревянную колодку или без нее (с большим слоем парафина), зажимают в объектодержатель. Установив нужный угол наклона ножа (оптимальный 13-15°) в зависимости от плотности ткани, медленно подводят нож к блоку, регулируют его высоту до соприкосновения с ножом. Сначала выравнивают поверхность блока, установив микрометрическую шкалу на получение толстых (20-25 мкм) срезов, затем шкалу переводят на 6-8 мкм и приступают к резанию материала. Как правило, нож располагается перпендикулярно, но возможно также получение срезов (особенно с более плотных объектов) ножом, который установлен под углом к станине микротома.

Срезы с блока осторожно снимают с помощью сухой или смоченной в спирте кисточки, используют также изогнутую препаровальную иглу или скальпель. Срезы обычно переносят в коробку, дно которой выстлано бумагой черного цвета, и укладывают матовой стороной вверх. После получения нужного количества срезов рядом с ними кладут блок или этикетку с номером. Удобнее сразу обработать 20-30 блоков, а затем приступить к монтированию срезов на предметные стекла.

Часто срезы наклеивают на предметное стекло непосредственно с ножа. Для этого их переносят в склянку с теплой (35-40°C) дистиллированной или кипяченой водой, а затем вылавливают на предметные

стекла, которые предварительно обезжиривают и натирают белком с глицерином. Срезы приклеивают на предметное стекло блестящей, обращенной к ножу стороной. Небольшие складочки на срезе можно расправить, осторожно дотрагиваясь до них углом согнутой препаровальной иглы.

Можно расправлять срезы непосредственно на стекле с помощью специального приспособления для сушки и расправления парафиновых срезов. Для этого на предметное стекло пипеткой наносят каплю воды и в нее опускают срез. Стекло со срезом помещают на нагреваемый столик прибора, где срез постепенно расправляется. После удаления избытка воды пипеткой или фильтровальной бумагой стекло со срезом подсушивают и одновременно срез плотно фиксируется на предметном стекле. На нагреваемом столике прибора помещается одновременно 45 предметных стекол, при его использовании не требуется дальнейшего просушивания стекол со срезами в термостате. Имеются специальные импортные ванночки для расправления срезов и переноса их на стекло. В них постоянно поддерживается оптимальная температура воды 38°C.

Продолжительность просушивания срезов в термостате при 37°C – 6-12 ч. В случае необходимости проведения срочной окраски срезы можно поместить на 10-15 мин. в термостат при 56°C до начала плавления парафина, что способствует лучшей фиксации среза на предметном стекле. Однако при этом несколько затрудняется депарафинирование: требуется применение дополнительной порции ксилола и увеличение продолжительности депарафинирования.

Существует сухой способ приклеивания срезов к стеклу, который пригоден только для срезов отличного качества. На предметное стекло, смазанное тонким слоем белка с глицерином, помещают срез, аккуратно расправляют его препаровальной иглой или скальпелем и слегка подогревают на спиртовке или нагреваемом столике.

2.3.3. Особенности работы на ротационном микротоме

Парафиновый блок приклеивают к металлическому блокодержателю и оплавливают горячим скальпелем с четырех сторон. Затем блокодержатель с объектом закрепляют в винтовой зажим и переводят в среднее положение (на уровне лезвия ножа). Нож, закрепленный под углом 7-9°, подводят до соприкосновения с объектом. После этого микрометрическую шкалу устанавливают на 20 мкм и выравнивают поверхность блока, затем переводят шкалу на 6-7 мкм. Первые срезы,

как правило, не используют, а последующие получают в виде серии при нескольких круговых поворотах рукоятки микротом. Серию срезов (4-6) осторожно отделяют от лезвия ножа и с помощью кисточки и препаровальной иглы переносят в коробочку с черной бумагой для дальнейшего разъединения и выбора лучших срезов.

После получения срезов парафиновые блоки снимают с блокировочного держателя с помощью скальпеля и убирают в архив. Р. Лилли (1969) рекомендует обрабатывать поверхность блока горячим парафином, что предохраняет ткань от высушивания и загрязнения.

Причины ошибок, встречающихся при резании материала, залитого в парафин, и их устранение.

Если парафин крошится:

- он слишком тверд;
- медленно охлаждался при заливке;
- низкая температура окружающей среды;
- большой угол наклона ножа.

Устранение:

- перед получением среза подышать на блок;
- изменить угол наклона ножа;
- перезалить объект.

Если ткань отделяется от парафина:

- заливка проводилась холодным парафином;
- плохая пропитка материала;
- при проводке остались следы спирта.

Устранение: перезалить блок, предварительно поместив его в промежуточную среду (для удаления спирта).

Если материал плохо режется, ткань белесого цвета, срезы сморщенные, плохо расправляются:

- недостаточное обезвоживание ткани.

Устранение: блок расплавляют в термостате и пропускают по батарее в обратном порядке до 100%-ного спирта, затем снова заливают по схеме.

Если нож как бы подскакивает, не срезая ткань, или на срезах обнаружены поперечные полосы:

- переуплотнение или пересушивание материала при фиксации или обезвоживании.

Устранение: резать материал, поместив на него кусочек льда; если срезы не получаются, то из архива надо вырезать новый кусочек, обезвоживать по схеме и перезалить.

Если срезы сморщенные, прилипают к поверхности ножа, закручиваются:

- недостаточный угол наклона ножа;
- высокая температура в помещении;
- материал залит в легкоплавкий парафин.

Устранение:

- изменить угол наклона ножа;
- перед получением срезов поместить материал в холодильник;
- перезалить в более тугоплавкий парафин.

Если срезы покрыты полосами и легко разрываются:

- плохое качество ножа (зазубрины);
- загрязнение парафина (плотные соринки);
- наличие в ткани солей кальция.

Устранение:

- передвинуть нож или сменить его на хорошо заточенный;
- декальцинировать объект или воспользоваться микротомом-пилой со специальными ножами, предназначенными для плотных тканей, керамики, синтетики и др.

2.3.4. Особенности работы на замораживающем микротоме

Материал, залитый в формалин или спирт, тщательно промывают в воде, затем вырезают кусочек толщиной 3-5 мм и смачивают его водой, а также смачивают водой кусочек фильтровальной бумаги площадью 2-3 мм. Сначала на столик микротомы кладут фильтровальную бумагу, а на нее – кусочек ткани, после чего, слегка придерживая его пальцем, начинают замораживание. Для этого открывают вентиль баллона, затем, то открывая, то закрывая кран у столика микротомы, выпускают углекислоту небольшими порциями. Для лучшего и экономичного замораживания кусочка часто используют маленький стаканчик или металлический колпачок, входящий в набор микротомы, которым накрывают кусочек. Углекислота скапливается под стаканчиком, что способствует быстрому замораживанию кусочка. Кусочек начинает белеть, т.е. замораживаться, снизу.

После полного замораживания столик вместе с кусочком осторожно подводят под нож и медленными движениями углом ножа ровняют поверхность объекта. Столик подают рукой до тех пор, пока вся поверхность кусочка не станет ровной. Затем прекращают подачу столика вручную и передвигают нож так, чтобы его середина проходила над объектом. Устанавливают нужный угол наклона ножа и регули-

руют подачу (до 5-6 мкм), переходя на автоматическую резку. Срезы с микротомного ножа снимают подушечкой указательного пальца и переносят в воду. Перемороженная ткань может крошиться; для устранения этого недостатка поверхность кусочка «подогревают» пальцем. Если на ноже образуется соскоб ткани, то для получения качественных срезов ткань следует слегка подморозить. Замороженные срезы обычно хранят в 5-12%-ном формалине или 70- либо 96%-ном спирте.

2.3.5. Подготовка предметных стекол

Предметные стекла, применяемые для получения гистологических препаратов, необходимо предварительно подготовить. Исключение составляют готовые к использованию и специально упакованные импортные предметные стекла.

Предметные стекла моют в теплой мыльной воде или кипятят в 2-3%-ном растворе гидрокарбоната натрия, затем ополаскивают горячей водой и промывают в течение нескольких часов в проточной воде. Вымытые стекла протирают чистой хлопчатобумажной тканью и на несколько дней помещают в смесь Никифорова: 96%-ный спирт и эфир (1:1). Обезжиренные стекла извлекают пинцетом из этой смеси, протирают чистой тканью и складывают в коробочку.

Для обезжиривания предметных стекол используют также хромовую смесь, в состав которой входят 100 г бихромата калия, концентрированной серной кислоты и 1000 мл горячей воды. Бихромат калия растворяют сначала в горячей воде, затем раствор охлаждают и после этого по стеклянной палочке осторожно по каплям добавляют серную кислоту. Стекла выдерживают в хромовой смеси 2-3 дня, а затем тщательно промывают в проточной воде в течение 1-2 дней.

Предметные стекла также хорошо обезжириваются в крепком растворе соляной кислоты. Через несколько суток их промывают проточной водой и высушивают.

Качество обезжиривания *можно проверить*, капнув на предметное стекло воду из пипетки: по обезжиренному стеклу вода растекается тонким слоем, а не собирается в каплю.

Для *лучшей фиксации срезов на стекле* его предварительно смазывают смесью белка с глицерином. Свежий яичный белок взбивают и фильтруют через крупнопористый фильтр, смоченный дистиллированной водой, затем размешивают с равным объемом глицерина и добавляют несколько кристаллов тимола. Смесь хранится в течение нескольких месяцев. Применяют также смесь, в состав которой входят

15 мл сыворотки крови, 5 мл дистиллированной воды и 6 мл 5%-ного формалина. После фильтрации смесь готова к нанесению на предметные стекла. Ее использование дает лучшие результаты, чем применение яичного белка, так как при окрашивании не образуется фон.

Для *нанесения белка* на обезжиренные предметные стекла в одну руку берут 5-6 стекол в виде веера, а в другую – чистую стеклянную палочку, которой наносят белок, прикасаясь к каждому стеклу. Затем белок растирают обезжиренным спиртом пальцем по поверхности стекла до его середины, прилагая небольшое усилие. Некоторые авторы рекомендуют натертое белком стекла прогревать в термостате, но опыт показывает, что это излишне, так как после переноса срезов на стекла их помещают в термостат или на специальный столик для просушивания, где одновременно происходит коагуляция белка.

Разработан *способ фиксации среза* к предметному стеклу без предварительного натирания последнего белком с глицерином. В ванночку с теплой дистиллированной водой капают несколько капель жидкого казеинового клея и перемешивают. В полученную мутноватую жидкость опускают срезы, расправляют препаровальной иглой и вылавливают на чистое обезжиренное стекло. Этот способ дает неизменно хороший эффект, и вокруг среза отсутствует окрашенный фон, как это часто бывает при применении белка.

2.4. Общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов

В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания.

Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например, нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например, выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии протравы, например, гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.

В гистологической практике применяют основные, кислотные и нейтральные красители.

Основные, или ядерные, красители – это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются *базофильными*. К ним относятся *гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый и др.*

Кислотные красители – это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются *эозин, кислый фуксин, конго красный (конгорот), эритрозин.*

Нейтральные красители: *судан III, судан IV, метиленовый синий.*

2.4.1. Подготовка срезов к окрашиванию

Депарафинирование срезов.

Парафиновые или целлоидин-парафиновые срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя – бензола, толуола, ксилола, бензина.

Депарафинирование осуществляют по следующей схеме.

<i>Ксилол I</i>	<i>10-15 мин.</i>
	(можно в термостате при 37°C)
<i>Ксилол II</i>	<i>3-5 мин.</i>
<i>Спирт 100% I</i>	<i>1-2 мин.</i>
<i>Спирт 100% II</i>	<i>ополоснуть</i>
<i>Спирт 96% I</i>	<i>ополоснуть</i>
<i>Спирт 96% II</i>	<i>ополоснуть</i>
<i>Дистиллированная вода</i>	<i>2 смены.</i>

После депарафинирования 100-150 препаратов реактивы нужно менять. Депарафинированные препараты готовы к окрашиванию сразу же после промывания в дистиллированной воде, но во избежание отклеивания срезов, особенно при окраске по Ван-Гизону, их лучше подсушить на воздухе. Если окрашивание производят не сразу, то депарафинированные и высушенные препараты аккуратно, чтобы не повредить срезы, складывают в коробки и окрашивают по мере необходимости.

Подготовка целлоидиновых срезов и срезов ткани, залитой в желатин. Для получения хороших результатов окраски препаратов ткани, залитой в целлоидин, не требуется специальная подготовка срезов. Их переносят из 70%-ного спирта в 50%-ный, а затем в дистиллированную воду.

В тех случаях, когда применяемый краситель окрашивает целлоидин, его можно удалить из ткани. Для этого целлоидиновые срезы наклеивают на покрытые белком с глицерином предметные стекла, плотно прижимают фильтровальной бумагой, смоченной в 70%-ном спирте, и заливают гвоздичным маслом; через 1 мин. срез на стекле обрабатывают ацетоном или абсолютным спиртом. После удаления целлоидина срез со стекла переносят в склянку с 70%-ным спиртом, а затем – в дистиллированную воду.

Желатин невозможно удалить из срезов, если блоки уплотнились в формалине. Желатиновые срезы, не обработанные в формалине, наклеивают на стекло, покрытое белком с глицерином, подсушивают, заливают 2-4%-ным раствором уксусной кислоты и помещают на 10-15 мин. в термостат при 37°C. Затем срезы промывают в дистиллированной воде и окрашивают.

2.4.2. Ядерные красители и их приготовление

Окрашивание ядер клеток обусловлено двумя механизмами химического взаимодействия:

- 1) основные красители, например, анилиновые, образуют соли в присутствии ДНК и РНК;
- 2) образуются комплексы с ионами металлов при применении протравы. В практической работе чаще используют протравные красители. К ним относятся гематоксилин, кармин, сафранин, галлоцианин, ализарин.

Хорошо окрашивают ядра такие красители, как *янус зеленый*, *основной коричневый*, *оксазиновые красители* (*крезиловый фиолетовый*, *нильский голубой*), *тианин*, *азуры*, *метиленовый синий*, *основной фуксин*, *метиловый зеленый* и др. Следует упомянуть о хороших результатах окраски ядер *соком черники*, которая предложена М.Д. Лавдовским еще в 1887 г.

Гематоксилин и способы его приготовления

Гематоксилин имеет растительное происхождение: его получают из эфирного экстракта кампешевого дерева. Гематоксилин хорошо растворяется в спирте и плохо в воде. Красящими свойствами обладает продукт окисления гематоксилина – гематеин, поэтому краситель становится пригодным только после созревания – окисления, на которое требуется от 10 дней до 2-3 нед. Созревание можно ускорить с помощью солей алюминия, хрома, железа и др.

Гематоксилин Эрлиха

<i>Гематоксилин кристаллический</i>	2 г
<i>Спирт 96%-ный</i>	100 мл
<i>Дистиллированная вода</i>	100 мл
<i>Глицерин</i>	100 мл
<i>Алюмокалиевые или алюмоаммонийные квасцы</i>	3 г
<i>Ледяная уксусная кислота</i>	10 мл

Гематоксилин растворяют в спирте, а квасцы – в дистиллированной воде, смешивают оба раствора и затем добавляют остальные компоненты. Раствор периодически перемешивают. Через 10-14 дней он приобретает темно-вишневый цвет, что свидетельствует о готовности красителя.

Продолжительность окрашивания гематоксилином Эрлиха – 4-6 мин. Затем следуют промывание в дистиллированной, потом в водопроводной воде, дифференцировка в 1%-ном солянокислом спирте, восстановление в аммиачной воде и окончательное промывание в дистиллированной воде.

Для приготовления солянокислого спирта к 100 мл 70%-ного спирта добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты, для приготовления аммиачной воды к 50 мл дистиллированной воды 2 капли крепкого аммиака.

Результат: ядра клеток (оболочка, хроматин) темно-синие, ядерный матрикс бледно-голубой или прозрачный.

Гематоксилин Делафильда

<i>Гематоксилин кристаллический</i>	4 г
<i>Спирт 96%-ный</i>	25 мл
<i>Алюмокалиевые или алюмоаммонийные квасцы</i>	40 г
<i>Дистиллированная вода</i>	400 мл

Растворенный в спирте гематоксилин смешивают с раствором квасцов, смесь держат на свету 3-4 дня, периодически перемешивая, затем фильтруют и добавляют 100 мл глицерина и 100 мл метилового спирта. Раствор оставляют на свету 3-4 дня, фильтруют, хранят в банке с притертой пробкой. Перед применением краситель разбавляют в 2 раза дистиллированной водой или слабым 2%-ным раствором алюмокалиевых квасцов.

Продолжительность окрашивания 4-6 мин., затем следуют промывание в дистиллированной воде, дифференцировка в солянокислом спирте, восстановление в аммиачной воде и окончательное промывание в дистиллированной воде.

Результат: хроматин и кариолема ярко-синие.

Гематоксилин Маллори (водный)

<i>Гематоксилин кристаллический</i>	2,5 г
<i>Алюмоаммонийные квасцы</i>	50 г
<i>Дистиллированная вода</i>	1000 мл

Раствор выдерживают 10 сут. при 25°C, добавляют 440 мг перманганата калия и 2,5 г тимола. Перемешивают несколько раз, перед окрашиванием фильтруют.

Продолжительность окрашивания 3-4 мин. Затем следуют те же процедуры, что и при окрашивании гематоксилином других модификаций.

Результат: ядра синие.

Кислый гемалаун Майера (водный)

<i>Гематоксилин кристаллический</i>	1 г
<i>Алюмоаммонийные квасцы</i>	50 г
<i>Дистиллированная вода</i>	1000 мл
<i>Йодат натрия</i>	200 мг
<i>Хлоралгидрат</i>	50 г
<i>Лимонная кислота</i>	1 г

Квасцы растворяют в воде без нагревания, затем добавляют и растворяют гематоксилин, йодат натрия, лимонную кислоту и последним – хлоралгидрат. После растворения всех компонентов краску фильтруют, и она готова к применению.

Продолжительность окрашивания – 4-6 мин.

Результат: ядра красно-фиолетовые.

Гематоксилин Корази (водный)

<i>Гематоксилин кристаллический</i>	0,1 г
<i>Йодат калия</i>	2-3 кристалла
<i>Алюмокалиевые квасцы</i>	5 г
<i>Дистиллированная вода (теплая)</i>	100 мл

Смесь перемешивают до полного растворения и добавляют 25 мл глицерина. Раствор перед использованием фильтруют.

Продолжительность окрашивания – 1-2 мин.

Результат: ядра ярко-синие.

Железный гематоксилин Гейденгайна

<i>Гематоксилин кристаллический</i>	1 г
<i>Спирт 96%-ный</i>	10 мл
<i>Дистиллированная вода</i>	90 мл

Краситель созревает 4 нед. Добавление 100 мг йодата натрия ускоряет «созревание» – он готов к использованию уже через 1 ч после приготовления. Окрашивание проводят разведенным в 2 раза раствором.

Продолжительность окрашивания – 1-36 ч.

Методика окрашивания

1. Препарат помещают в 2,5%-ный раствор железоммонийных квасцов на 2-12 ч.
2. Ополаскивают в дистиллированной воде.
3. Окрашивают гематоксилином Гейденгайна 1-36 ч.
4. Промывают в водопроводной воде – 3 смены по 10 мин., затем обезвоживают, просветляют, заключают.

Результат: ядра и цитоплазматические структуры черные и синевато-черные.

Железный гематоксилин Вейгерта

<i>Гематоксилин кристаллический</i>	<i>1 г</i>	} раствор А
<i>Спирт 96%-ный</i>	<i>100 мл</i>	
<i>Раствор</i>		} раствор В
<i>трихлорида железа гексагидрата 50%-ный</i>	<i>4 мл</i>	
<i>Дистиллированная вода</i>	<i>95мл</i>	
<i>Концентрированная соляная кислота</i>	<i>1 мл</i>	

Растворы хранят в отдельных склянках с притертыми пробками. Перед использованием нужное для окрашивания количество краски получают путем смешивания растворов А и Б в пропорции 1:1.

Продолжительность окрашивания – 1-2 мин., затем промывают в водопроводной воде.

Результат: ядра черно-синие.

Другие ядерные красители

Кармин

<i>Кармин</i>	<i>1 г</i>
<i>Дистиллированная вода</i>	<i>100 мл</i>

Раствор кипятят 15 мин., охлаждают, фильтруют, добавляют 10 мл 40%-ного формалина.

Продолжительность окрашивания 30 мин.-24 ч. Затем следуют промывание в дистиллированной воде, дифференцировка в соляно-кислом спирте, обезвоживание, просветление и заключение.

Результат: ядра ярко-красные.

Сафранин

Обеспечивает получение хороших результатов после фиксации ткани в тетраоксиде осмия и особенно после применения фиксаторов, содержащих хром.

Основной раствор	{	<i>Сафранин</i>	10 г
		<i>Спирт 96%-ный</i>	55 мл
		<i>Дистиллированная вода</i>	145 мл
Краситель	{	<i>Основной раствор</i>	20 мл
		<i>Спирт 50%-ный</i>	80 мл

Продолжительность окрашивания – 24 ч. Затем следуют промывание дистиллированной водой, дифференцировка в солянокислом спирте, дистиллированная вода, обезвоживание, просветление и заключение.

Результат: хроматин ядер и кариолема ярко-красные.

Галлоцианин

Рекомендуется для окрашивания тканей, залитых в желатин.

<i>Галлоцианин</i>	100 г
<i>Хромовые квасцы</i>	5 г
<i>Дистиллированная вода</i>	100 мл

Сначала растворяют квасцы, затем добавляют галлоцианин, раствор кипятят при постоянном помешивании, охлаждают, фильтруют. Срок годности красителя – 1 мес.

Продолжительность окрашивания составляет 24-48 ч. Затем следуют промывание в 2 сменах дистиллированной воды, обезвоживание, просветление и заключение.

Результат: хроматин и тигроидное вещество синевато-черные.

Сок черники

Свежие чистые ягоды черники разминают в фарфоровой ступке, смешивают с равным объемом 96%-ного спирта, настаивают 1-2 сут. и фильтруют. Перед окрашиванием часть раствора разводят равным количеством 2%-ного водного раствора алюмокалиевых квасцов и добавляют 2-3 кристаллика тимола.

Продолжительность окрашивания – 5-7 мин. Затем следуют промывание в дистиллированной воде, дифференцировка в солянокислом спирте, промывание в дистиллированной воде, обезвоживание, просветление и заключение.

Результат: ядра темно-фиолетовые.

2.4.3. Цитоплазматические красители

Окрашивание цитоплазмы клеток происходит в результате связывания оснований и белков кислотными красителями. В группу диффузных (кислых) красителей входят *карбоновые и сульфоновые кислоты, нитро-, азокрасители и др.* В гистологической практике постоянно применяют *эозины, пикриновую кислоту, оранжевый Г, кислый фуксин, конго красный (конгорот), азокармин, эритрозин.*

Чаще используют 1%-ные водные растворы этих красителей, но можно применять и 1%-ный спиртовой раствор. Продолжительность окрашивания колеблется от 5 с до 3-5 мин. в зависимости от сорта и серии красителя. Если препарат перекрашивается, то излишек краски легко удаляется при ополаскивании в дистиллированной воде и последующем обезвоживании препарата или среза в спиртах. Смесь кислого фуксина и пикриновой кислоты (пикрофуксин) готовят из насыщенного водного раствора пикриновой кислоты и 1%-ного водного раствора кислого фуксина.

2.4.4. Замечания по технике окрашивания

При окраске водными красителями срезы переносят в краситель из дистиллированной воды, а при окраске спиртовыми – из соответствующего раствора спирта. После того как препарат приобретает интенсивную окраску, его промывают в воде или спирте для удаления избытка красителя (дифференцировка), контролируя этот процесс под микроскопом.

Срезы тканей после целлоидиновой и парафиновой заливки, а также полученные на замораживающем микротоме окрашивают в широкогорлых бюксах или на часовых стеклах. Одновременно окрашивают несколько срезов, промывают, дифференцируют и т.д. каждый срез отдельно.

Препараты можно помещать в красящий раствор в специальных контейнерах, предназначенных для одновременного окрашивания большого количества стекол. Если препаратов немного, то рациональнее краситель наносить непосредственно на срез по каплям с помощью пипетки. Остатки красителя можно слить в склянку и использовать повторно. Д. Кисели (1962) предлагал накрывать при этом срезы стеклянным колпаком, а для увлажнения среды оставлять под колпаком смоченную водой вату.

2.4.5. Просветление и заключение срезов

Одним из основных условий, определяющих пригодность гистологических препаратов к микроскопическому исследованию, является их прозрачность. Кроме того, препараты должны быть защищены от высыхания и загрязнения. Все это обеспечивается просветлением и заключением в специальные среды, которые можно подразделить на смешивающиеся с водой (глицерин, гуммиарабик, поливиниловый спирт, желатин) и не смешивающиеся с водой (ксилол, толуол, их смеси с фенолом, эфирные масла).

Смешивающиеся с водой просветляющие вещества одновременно являются средой для заключения и приготовления постоянных препаратов.

Заключение в среды, смешивающиеся с водой.

Из этих сред чаще применяют глицерин-желатин. Используют также чистый глицерин, однако этот метод не позволяет готовить постоянные препараты.

Р. Лилли рекомендует для этих целей гумми-сироп Апати:

<i>чистый гуммиарабик</i>	<i>50 г</i>
<i>сахар-рафинад</i>	<i>50 г</i>
<i>дистиллированная вода</i>	<i>50 мл.</i>

Смесь растворяют на водяной бане при постоянном помешивании, затем добавляют 500 мг тимола. Используют также поливиниловый спирт.

Среды, смешивающиеся с водой (кроме глицерина), предварительно нагревают на водяной бане, капают нагретой стеклянной палочкой или пипеткой на расправленный срез, слегка подсушивают и покрывают чистым и сухим покровным стеклом. Чистой стеклянной палочкой или обезжиренным пальцем слегка прижимают покровное стекло. При этом излишки среды выдавливаются и их аккуратно удаляют чистой тканью.

Для длительного хранения препаратов, чтобы избежать их высыхания, многие авторы рекомендуют окантовывать покровное стекло тонким слоем парафина или целлоидина. Однако опыт показывает, что заключенные в глицерин-желатин препараты и без окантовки хорошо сохраняются свыше 10 лет.

Просветление препаратов и заключение в среды, не смешивающихся с водой.

Срезы, наклеенные на стекло или препараты, тщательно обезвоживают в спиртах (70-, 96- и 100%-ном), а затем помещают в любые из просветляющих веществ. Установлено, что для разных исследований предпочтительнее то или иное просветляющее вещество. Так, при окраске по Нисслию и методу Грама-Вейгерта лучшим просветляющим и одновременно дифференцирующим средством является анилиновое масло, но для просветления препаратов при окраске по Ван-Гизону использование его недопустимо. Наиболее распространенными и индифферентными по отношению к красителям веществами являются толуол и ксилол, а также их смеси с фенолом (кристаллический фенол расплавляют в термостате при 56°C и смешивают с ксилолом в порции 1:4 или 1:6).

Хорошо обезвоженные в спиртах и просветленные в карбол-ксилоле, а затем в чистом ксилоле препараты готовы к заключению в специальные смолы. С этой целью применяют смолы растительного происхождения – бальзамы (канадский, пихтовый и сибирский кедровый). Все они хорошо растворяются в толуоле и ксилоле.

Метод растворения: в склянку с сухой смолой заливают толуол, который постепенно растворяет верхние слои смолы. Процесс можно ускорить, если склянку поместить в термостат при 37-40°C. Полученный густой раствор сливают в другую банку и добавляют новую порцию толуола, одновременно перемешивая раствор и доводя до консистенции жидкого меда. Слишком жидкий раствор по мере испарения толуола вновь загустевает. Приготовленный бальзам хранят в плотно закрытой посуде.

2.5. Обзорные методы окраски тканей

2.5.1. Общая схема окраски гематоксилином и эозином

Используется практически при окрашивании всех видов тканей. Вариации окраски зависят от вида применяемого гематоксилина, иногда требуются и специальные методы фиксации.

Процедура окрашивания срезов, полученных на замораживающем микротоме, после парафиновой или целлоидиновой заливки различается лишь по техническим приемам, а порядок проведения окраски одинаков.

Дистиллированная вода

ополоснуть

<i>Раствор гематоксилина</i>	<i>1-20 мин.</i>
<i>Дистиллированная вода</i>	ополоснуть
<i>Солянокислый спирт</i>	дифференцировка
<i>Аммиачная вода</i>	срезы синеют
	(контроль под микроскопом)
<i>Проточная вода</i>	<i>5-10 мин.</i>
<i>Дистиллированная вода</i>	ополоснуть
<i>Раствор эозина</i>	<i>10 с-3 мин.</i>
Спирт 96%-ный, карбол-ксилол, заключение.	

Результат: ядра синие, цитоплазма и межклеточное вещество розовые.

2.5.2. Окрашивание соединительной и мышечной тканей

К обзорным относятся такие способы окраски, с помощью которых контрастно окрашиваются клетки, коллагеновые волокна и мышечная ткань. Существуют два основных принципа окрашивания коллагеновых структур: *анионовыми (кислыми) красителями* и *фосфорно-вольфрамовым* или *фосфорно-молибденовым гематоксилином*. Общепризнанными являются окраски по методу Ван-Гизон и её модификации, по методу Маллори.

Окраска по методу Ван-Гизон

Для окрашивания ядер используют железный гематоксилин Вейгерта, который готовят по мере необходимости путем смешения двух растворов. Рабочий раствор можно хранить в холодильнике не более 2 нед. Правильно приготовленный гематоксилин должен иметь темно-фиолетовый цвет и быть стойким, при побурении или позеленении он непригоден. Окрашивание ядер в бурый цвет вместо черного считают дефектом метода.

Пикрофуксин по Меркулову готовят путем смешивания 1%-ного водного раствора кислого (не основного!) фуксина и насыщенного при комнатной температуре водного раствора пикриновой кислоты в соотношении 1:10. По прописи J. Van Gieson, красящую смесь готовят, смешивая 5 мл 1%-ного раствора кислого фуксина и 95 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Добавляя к этой смеси 0,25 мл концентрированной соляной кислоты, получают более контрастные препараты: мышцы окрашиваются в ярко-желтый цвет, а коллаген – в более яркий красный.

Методика окраски

1. Срезы ополаскивают водой и окрашивают в железном гематоксилине Вейгерта в течение 3-5 мин. (если рабочий раствор хранился несколько дней, то продолжительность окрашивания увеличивают до 10 мин.).
2. Промывают в 2-3 порциях водопроводной воды.
3. Окрашивают в пикрофуксине 2-5 мин.
4. Быстро ополаскивают в воде, обезвоживают и дифференцируют окраску волокон, проводя срезы через несколько смесей 96- и 100%-ного спиртов.
5. Просветляют в карбол-ксилоле, ксилоле, заключают в бальзам или синтетическую среду.

Результат: ядра черные или темно-коричневые, коллагеновые волокна красные, цитоплазма (особенно гладких и поперечно исчерченных мышц), а также кератин и эритроциты желтые.

Для выявления элементов **центральной нервной и периферической нервной** системы обычно применяют различные способы импрегнации (серебром, золотом, осмием). Окрашивать тела нервных клеток и их отростки можно и метиленовым синим. Существует много модификаций импрегнации нервных клеток и волокон. Наиболее распространенными являются методы Бильшовского.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Акаевский А.И. Анатомия сельскохозяйственных животных / А.И. Акаевский, Ю.Ф. Юдичев, Н.В. Михайлов, И.В. Хрусталёва. М., 1984. 543 с.
2. Александровская О.В. Цитология, гистология и эмбриология / О.В. Александровская, Т.Н. Радостина, Н.А. Козлов. М., 1987. 448 с.
3. Быков В.Я. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека) / А.Я. Быков. Спб.: СОТИС, 2002. 520 с.
4. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техникой. / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. 2-е изд. М.: Медицина, 1982. 304 с.
5. Вракин В.Ф. Морфология сельскохозяйственных животных / В.Ф. Вракин, М.З. Сидорова. М., 1991. 528 с.
6. Гистология, цитология и эмбриология / под ред. Ю.И. Афанасьева, Н.А. Юрина. М.: Медицина, 2002. 744 с.
7. Жаров А.В. Методические указания по патогистологической технике / А.В. Жаров. М.: ИПЦ Политера, 2005. 88 с.
8. Меркулов Г.А. Курс патологической техники / Г.А. Меркулов. 5-е изд. Л.: Медицина, 1969. 645 с.
9. Микроскопическая техника: руководство / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.А. Перова. М.: Медицина, 1996. 544 с.
10. Хэм А. Гистология / А. Хем, А. Хрусталёв, Д. Кормак. М., 1982-1983. Т. 1-5. 272, 254, 293, 245, 296 с.
11. Хрусталёва И.В. Анатомия домашних животных / И.В. Хрусталёва, Н.В. Михайлов, Я.И. Шнейберг, Н.А. Жеребцов, Н.А. Слесаренко, Б.В. Криштофорова. 3-е изд. М.: Колос, 2000. 704 с.
12. Юшканцева С.И. Гистология, цитология и эмбриология. Краткий атлас: учебное пособие / С.И. Юшканцева, В.Я. Быков. 2-е изд. СПб.: П-2, 2007. 120 с.

Учебное издание

*Овчаренко Нина Дмитриевна
Сафронова Елена Дмитриевна*

**ОБЩАЯ ГИСТОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ
МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ**

Учебное пособие

Редактор С.И. Тесленко
Технический редактор И.В. Сильченко

Подписано в печать 07.04.2011 г. Формат 60x84/16.
Бумага для множительных аппаратов. Гарнитура «Times New Roman».
Печать ризографная. Усл. печ. л. 4,8, Уч.-изд. л. 3,8.
Тираж 100 экз. Заказ №

Издательство АГАУ
656049, г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98,
тел. 62-84-26