

Федеральное агентство по образованию  
Новосибирский государственный  
педагогический университет

А.В. Сахаров

А.А. Макеев

**РУКОВОДСТВО  
К ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИМ  
ЗАНЯТИЯМ ПО БИОЛОГИИ КЛЕТКИ**

*Утверждено в качестве учебно-методического пособия  
Редакционно-издательским советом НГПУ*

Новосибирск  
2008

УДК 576 (075.8)

ББК 28.05 я 73-1

С 221

Р е ц е н з е н т ы:

доктор биологических наук, профессор НГМУ

*Г.В. Правоторов;*

кандидат биологических наук, доцент НГАУ

*Ю.Д. Шмидт*

**Сахаров А.В.**

С 221 Руководство к лабораторным занятиям по биологии клетки / А.В. Сахаров, А.А. Макеев. - Новосибирск: Изд. НГПУ, 2008. – 54 с.

В учебно-методическом пособии рассматриваются вопросы организации лабораторно-практических занятий по дисциплине «Биология клетки». Представлены варианты заданий для проведения лабораторных работ и внеаудиторных занятий.

Пособие предназначено для студентов высших учебных заведений педагогического профиля и аспирантов.

УДК 576 (075.8)

ББК 28.05 я 73-1

© НГПУ, 2008

## Тема 1: Устройство и правила работы со световым микроскопом.

### Методы световой микроскопии.

**Цель:** Изучить строение светового микроскопа, освоить технику микроскопирования.

#### Задачи:

1. изучить устройство систем светового микроскопа;
2. отработать технику микроскопирования объектов в проходящем свете

**Оборудование:** микроскоп, готовый микропрепарат.

#### Теоретический минимум

**Микроскопия** (лат. микро – мелкий, маленький и окулюс – глаз) – изучение объектов с использованием *микроскопа*.

**Микроскоп** – прибор для получения увеличенного изображения объектов или деталей их структур, не видимых невооруженным глазом.

**Световая микроскопия** является основным, специфическим методом изучения микроскопических биологических объектов: клеток и внутриклеточных структур.

Схема 1.



**Микроскопия в проходящем свете** осуществляется с использованием светового микроскопа. Несмотря на широкий парк существующих современных микроскопов, в основе их строения лежит принцип микроскопа, впервые сконструированного в 1590 г. З. Янсенем.

**Нарисовать и обозначить системы светового микроскопа.**

Конструктивно в микроскопе выделяют следующие системы:

1. **оптическая система;**
2. **осветительная система;**
3. **механическая система.**

**Оптическая система** микроскопа включает в себя окуляр и объектив.

**Объектив** – это система линз, вставляемая в **тубус** снизу и непосредственно направляемая на объект (отсюда - и название).

Различают объективы **сухие** и **иммерсионные**.

При работе с сухими объективами между линзой объектива и объектом исследования находится воздух. В случае использования иммерсионных объективов между линзой объектива и объектом исследования должна находиться иммерсионная среда (например, кедровое или минеральное масло, водный раствор глицерина, вода и др.).

Характеристики наиболее распространенных объективов приведены в таблице:

| Маркировка объектива | Иммерсия | Увеличение | Числовая апертура | Разрешающая способность, мкм |
|----------------------|----------|------------|-------------------|------------------------------|
| 8×0,20               | Нет      | 8          | 0,20              | 1,80                         |
| 20×0,40              | Нет      | 20         | 0,40              | 0,90                         |
| 40×0,65              | Нет      | 40         | 0,65              | 0,55                         |
| 40×0,75              | Водная   | 40         | 0,75              | 0,48                         |
| 90×1,25              | Масляная | 90         | 1,25              | 0,29                         |

Важнейшей характеристикой объектива является разрешающая способность.

**Разрешающая способность** – это расстояние между точками (линиями), которые видны раздельно.

- Разрешающая способность светового микроскопа ограничена длиной световых волн.
- Невооруженный глаз человека имеет разрешающую способность около 100 мкм.
- Видимая область спектра – (400-700 нм).
- Максимальное разрешение микроскопа в этом случае может быть не выше 200-350 нм (0,2-0,35 мкм).

**Окуляр** (лат. окулюс – глаз) вставляется в тубус сверху. Обычно используется окуляры с увеличением: x7, x10, x15.

**Нарисовать схему прохождения световых лучей при микроскопировании в проходящем свете.**

*Результирующее увеличение микроскопа* равно увеличению окуляра, умноженному на увеличение объектива (эти величины приведены на каждом окуляре и объективе). Например:  $20 \times 10 = 200$  раз.

*Функция оптической системы* – формирование увеличенного изображения препарата на сетчатке глаза наблюдателя.

**Осветительная система** микроскопа включает:

- источник света,
- зеркало,
- конденсор
- диафрагма.

*Источник света* может быть встроен в микроскоп, а может находиться и вне микроскопа (пример, обычная настольная лампа).

*Зеркало* собирает лучи от источника освещения и направляет их на препарат снизу.

Одна поверхность зеркала – плоская (используется при естественном освещении), вторая – вогнутая (используется при искусственном освещении).

*Конденсор* состоит из линз, которые фокусируют лучи света на препарате. Поднимая и опуская конденсор (с помощью винта), можно настраивать фокусировку лучей.

*Диафрагма* вмонтирована в конденсор – это система непрозрачных пластинок с отверстием посередине. Она ограничивает световой поток, падающий на препарат. При использовании объективов с большим увеличением отверстие диафрагмы следует уменьшить – для ослабления сферической аберрации.

**Механическая система** микроскопа включает:

- тубус,
- штатив,
- колонка,
- предметный столик,
- препаратоводитель,
- макро- и микрометрический винты (они используются для поднимания и опускания тубуса с объективами с целью фокусировки изображения объекта на сетчатке глаза наблюдателя).

**Схема прохождения световых лучей через системы микроскопа:**

источник света ➡ зеркало ➡ конденсор ➡ диафрагма ➡ препарат ➡ объектив ➡ тубус ➡ окуляр.

**Нарисовать и обозначить системы фазовоконтрастного микроскопа**

—



### **Правила работы со световым микроскопом:**

1. Установить микроскоп окуляром к себе, предметным столиком от себя.

2. Включить источник освещения (при условии, что он конструктивно связан с микроскопом). При отсутствии источника освещения в микроскопе необходимо установить объектив малого увеличения в рабочее положение. Для этого повернуть револьвер с объективами и установить объектив с минимальным значением увеличения в срединное положение, при этом в револьвере сработает устройство-защелка (слышится легкий щелчок). Смотря в окуляр и используя вогнутую/плоскую поверхность зеркала добиться наилучшей освещенности.

3. Установить предметное стекло с изучаемым объектом на предметный столик таким образом, чтобы объект оказался в центре отверстия на предметном столике. Смотря на предметное стекло со стороны (окуляр на этом этапе не используется) и вращая макрометрический винт по часовой стрелке опустить тубус с объективом на уровень 0,5 см от предметного стекла.

4. Смотря в окуляр и медленно вращая макровинт против часовой стрелки поднимать тубус с объективом до тех пор, пока не покажутся контуры изучаемого объекта. Вращая микровинт по или против часовой стрелки добиться контрастности изображаемого объекта.

5. Поднимая/опуская конденсор, открывая/прикрывая диафрагму добиться наилучшей освещенности и контрастности изучаемого объекта.

6. При переходе к изучению объекта с использованием объективов с высокими показателями увеличения, необходимо отцентрировать препарат, т.е. поместить объект или ту его часть, которую вы рассматриваете, в центр поля зрения. Для этого, глядя в окуляр, перемещать препарат с помощью винтов-препаратоводителей, пока объект не займет нужное положение. Если объект не будет центрирован, то при большом увеличении он может оказаться вне поля зрения.

7. Вращая револьвер, перевести в рабочее положение объектив большого увеличения. Используя микрометрический винт, а также технику работы с конденсором и диафрагмой, указанными в пункте 5, добиться оптимальной четкости, контрастности и освещенности изучаемого объекта. Необходимо помнить, что при работе с объективами большого увеличения **запрещается использование макровинта**. Данный методический прием сохраняется на всех этапах микроскопирования (от малого увеличения к более высоким).

**Нарисовать и обозначить системы интерференционного микроскопа**

—

8. При использовании иммерсионных объективов непосредственно на препарат поместить капля иммерсионной среды и вращением револьвера установить необходимый объектив, который погружается в иммерсионную среду. Четкость, контрастность и освещенность объекта осуществляется согласно пункту 5.

9. После окончания микрофотографирования необходимо отключить источник освещения (если он вмонтирован в микроскоп), вращая револьвер установить наименьшее значение объектива в рабочее положение, убрать микропрепарат. В случае использования иммерсионной среды протереть линзу объектива сухой салфеткой, а затем специальным раствором.

#### **Задания:**

1. изучить устройство и принцип работы механической системы светового микроскопа;
2. изучить устройство и принцип работы оптической системы светового микроскопа;
3. изучить устройство и принцип работы осветительной системы светового микроскопа;
4. зарисовать и обозначить в рабочей тетради системы светового микроскопа;
5. нарисовать в рабочей тетради схему прохождения световых лучей при микрофотографировании в проходящем свете;
6. подготовить микроскоп для микрофотографирования объекта, используя искусственное освещение;
7. подготовить микроскоп для микрофотографирования объекта, используя естественное освещение;
8. добиться четкости, контрастности и яркости изображения объекта используя настройки соответствующих систем микроскопа при микрофотографировании на малом и большом увеличении.

#### **Контрольные вопросы:**

1. перечислить функции, который выполняет световой микроскоп;
2. перечислить элементы механической системы светового микроскопа;
3. перечислить элементы оптической системы светового микроскопа;
4. перечислить элементы осветительной системы светового микроскопа;

**Нарисовать и обозначить системы поляризационного микроскопа.**

—

5. назвать преимущества и недостатки световой микроскопии;
6. перечислить возможные пути увеличения разрешающей способности светового микроскопа;
7. назвать теоретический предел разрешающей способности светового микроскопа;
8. перечислить основные требования, предъявляемые к объекту микроскопирования;
9. перечислить порядок работы с иммерсионными объективами;
10. назвать поверхность зеркала которая используется при искусственном и естественном освещении.

## **Тема 2. Методы изготовления микроскопических препаратов, визуализации и анализа изображения объектов (20 часов).**

**Цель:** изучить методы изготовления временных и постоянных препаратов использующихся для цитологического анализа.

### **Задачи:**

1. освоить методику подготовки проб воды для витального изучения одноклеточных живых организмов;
2. отработать методику изготовления мазка крови;
3. отработать методику изготовления мазка-отпечатка;
4. отработать методику изготовления пленки;
5. отработать методику изготовления гистологического среза;
6. отработать методики окрашивания препаратов;
7. освоить методику визуализации и анализа изображения объектов.

### **Теоретический минимум**

#### **Взятие материала**

*Взятие материала* – это извлечение клеток, а также кусочков тканей из биологического объекта.

**Требования**, предъявляемые к взятию материала:

- производиться острым инструментом (предотвращает травматизацию ткани);
- толщина образца не должна превышать 5 мм\*;
- необходима маркировка образца (указывается орган, номер животного, дата забора и др.).

---

\* Параметр обусловлен скоростью диффузии фиксирующего раствора в ткань.

**Нарисовать схему взятия, фиксации, поводки материала и его заливки в парафин.**

## Фиксация

*Фиксация* – это процесс быстрой консервации клеточных структур, при котором останавливаются все физиолого-биохимические процессы, а водорастворимые вещества переходят в нерастворимое состояние. Фиксация позволяет сохранить внутриклеточные структуры в неизменном виде на длительное время.

Существуют физические (высокая или низкая температура) и химические (простые и сложные соединения) методы фиксации.

**Требования**, предъявляемые к фиксатору:

- высокая скорость диффузии в ткань;
- максимальная сохранность структур;
- объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала не менее, чем в 50 раз.

Одним из лучших фиксаторов является метиловый спирт, это обусловлено его высокой скоростью диффузии в ткань. Наиболее распространенным является 10-% водный раствор формальдегида.

**Виды препаратов, используемых для цитологического анализа.**

По характеру взятого материала различают следующие виды препаратов:

- **нативные пробы жидких сред** (например, вода, ликвор, секрет желез, суспензия первичной культуры клеток и др.);
- **мазок** (например, мазок крови, костного мозга и др.);
- **мазок-отпечаток** (например, селезенки, тимуса, печени и др.);
- **пленка** (например, плевры, мягкой мозговой оболочки и др.);
- **гистологический срез** (например, почки, печени, костной ткани и др.).

При цитологическом анализе исследуется не только отдельные клетки, но и клетки в составе ткани, поэтому одним из видов препаратов являются гистологические срезы.

**Требования**, предъявляемые к гистологическому препарату:

- должен максимально сохранять *прижизненное* состояние структур;
- быть максимально *тонким* и *прозрачным*;
- быть контрастным;
- длительность хранения.

**Нарисовать схему поводки материала и его заливки в парафин.**



## **Занятие №1. Освоение методики витального изучения живых организмов, визуализации и анализа изображения (4 часа).**

**Оборудование и реактивы:** аквариум с поликультурой гидробионтов, химический стакан, предметные стекла с лункой, пипетки, фильтровальная бумага, комплекс оптико-структурного анализа.

### **Методика витального исследования живых организмов:**

1. произвести пипеткой последовательно забор воды:  
с поверхности, средней части и дна аквариума в количестве по 5 мл и перенести в химических стакан;
2. тщательно перемешать образцы воды;
3. перенести пипеткой каплю воды в лунку предметного стекла;
4. рекомендуется микроскопировать при увеличении объективов 20 х. и 40 х. при опущенном конденсоре.

**Результат:** на темном фоне отчетливо заметны различные формы жгутиковых, движения инфузорий, коловраток и др.

### **Методика визуализации и анализа изображения объектов:**

1. установить препарат на предметном столике микроскопа;
2. используя систему объективов, установить требуемое увеличение;
3. запустить программу Axio Vision и с помощью цифровой камеры сформировать изображение объекта, сохранить файл;
4. открыть сохраненный файл и, используя панель настройки, задать параметры измерения (длина, площадь, периметр, ядерно-цитоплазматическое отношение);
- 5) запустить автоматическую программу статистической обработки данных;
- б) 6. сохранить результаты измерений в таблице, либо оформить в виде гистограммы или графика.

### **Задания:**

1. произвести забор пробы воды из поверхностного слоя аквариума и используя технику микроскопии в проходящем свете определить наличие живых объектов;
2. произвести забор пробы воды из средней части аквариума и используя технику микроскопии в проходящем свете определить наличие живых объектов;
3. произвести забор пробы воды из донной части аквариума и используя технику микроскопии в проходящем свете определить наличие живых объектов;

**Нарисовать батарею для депарафинирования и регидратации среза.**

4. используя комплекс оптико-структурного анализа создать электронные фото- и видео файлы с изображением исследуемых объектов;
5. используя комплекс оптико-структурного анализа произвести морфометрическую обработку исследуемых объектов.

## **Занятие № 2. Освоение методик изготовления, окрашивания и цитологического анализа мазка, мазка-отпечатка (4 часа).**

Занятие проводится с использованием лабораторных животных (рыба).

**Оборудование и реактивы:** ножницы хирургические, иглы для взятия крови, шприц, предметное стекло, стекло со шлифованными гранями для изготовления мазков, лезвие или скальпель, фильтровальная бумага, спиртовка, гепарин, 100° спирт, краситель Мая-Грюнвальда, гематоксилин Бемера.

### **Методика забора крови:**

1. уложить рыбу на бок и зафиксировать рукой;
2. иглу, предварительно смоченную гепарином, ввести под углом 45° между грудными плавниками на 1-2 см по направлению к сердцу;
3. после появления капли крови присоединить шприц и забрать 1-3 мл крови.

### **Методика изготовления мазка:**

1. поместить 1 каплю крови на предметное стекло;
2. стекло со шлифованными гранями подвести к капле крови под углом 45° таким образом, чтобы оно коснулось крови;
3. мазок произвести плавным равномерным движением стекла со шлифовальными гранями по направлению вперед.

### **Методика окрашивания мазка:**

1. уложить предметное стекло с мазком на столик;
2. высушить мазок при комнатной температуре (3-5 минут);
3. нанести на мазок фиксатор – 100° этанол (10-15 минут);
4. окрасить мазок красителем Мая – Грюнвальда (10-15 минут);
5. промыть срез в проточной воде 1-2 минуты, промокнуть фильтровальной бумагой.

**Результат:** ядра лейкоцитов окрашиваются в синий цвет, цитоплазма - в розовый; гранулы лейкоцитов - от интенсивно красного до фиолетового цвета.

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию тотального препарата одноклеточных беспозвоночных животных, произвести морфометрическую обработку объектов.**

### **Методика изготовления мазка-отпечатка:**

1. рыбу декапитировать хирургическими ножницами;
2. вскрыть брюшную полость и поместить печень в чашку Петри;
3. печень рассечь лезвием и осторожно осушить поверхность разреза фильтровальной бумагой;
4. обезжиренное стекло слегка нагреть над пламенем спиртовки и коснуться поверхности разреза;
5. мазок высушить на воздухе и окрасить гематоксилином Бемера.

### **Методика окрашивания мазка-отпечатка:**

1. накрыть мазок фильтровальной бумагой и нанести на него краситель – гематоксилин Бемера (10 минут);
2. не сливая краситель, нанести дистиллированную воду из расчета 1 часть красителя к 2 частям воды еще на 10 минут;
3. убрать фильтровальную бумагу, мазок быстро промыть в дистиллированной воде, сушить фильтровальной бумагой.

**Результат:** ядро клетки окрашивается в интенсивно синий цвет, цитоплазма в бледно розовый.

**Методика цитологического анализа** включает в себя общую оценку и характеристику клеток по следующим показателям:

1. фон препарата;
2. количество клеток;
3. расположение клеток;
4. размеры и форма клеток;
5. форма, размеры, расположение, количество и окрашиваемость ядра;
6. ядерно-цитоплазматическое отношение;
7. характеристика хроматина;
8. характеристика ядрышка;
9. пролиферативная активность;
10. характеристика цитоплазмы.

### **Теоретический минимум**

*Фон препарата* – имеет большое значение при определении интенсивности окрашивания клеток, поскольку между оптической плотностью и концентрацией выявляемого вещества имеется прямо пропорциональная зависимость (например, гликопротеидов в клетке паренхиматозных органов и строме).

*Количество* клеток определяется прочностью межклеточной связи, обилием стромы, пролиферацией и гибелью клеток.

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию мазка крови, произвести его цитологический анализ.**

*Расположение клеток*, а также образование ими агрегатов (кластеров) имеет значение при оценке реактивного ответа клеток на эндогенные и экзогенные воздействия.

*Размеры клеток* – от мелких (размер лимфоцитов) до крупных и даже гигантских (яйцеклетка).

*Форма клеток* – округлая, овальная, вытянутая, веретенообразная, полигональная, неправильная.

*Форма ядра* – округлая, овальная, полигональная (неправильная), вытянутая (веретенообразная), бобовидная, булавовидная, перекрученного жгута.

*Размеры ядра* – мелкое (например, размер ядра лимфоцита), средние, крупное, гигантское.

*Расположение ядра в клетке* – центрально, эксцентрически, занимает почти всю клетку.

*Количество ядер* – от нуля (эритроцит) до нескольких десятков (мегакариоцит).

*Окрашиваемость ядра* – гипохромно или гиперхромно.

*Ядерно-цитоплазматическое отношение* – может сдвигаться в пользу ядра или цитоплазмы, что может рассматриваться как один из признаков дифференцировки клеток.

*Характеристика хроматина* – хроматин может быть равномерным, регулярным, тонкодисперсным, мелкозернистым, грубозернистым, глыбчатым. Хроматин распределен по краю ядерной мембраны не равномерно, либо равномерно, либо разряжен.

*Характеристика ядрышка* – наличие (определяется, просматривается, либо не просматривается), количество ядрышек, форма (округлая, овальная, неправильная), размеры, четкость границ. по следующим признакам

*Пролиферативная активность* – характеризует наличие митозов (в том числе атипичных); многоядерных клеток; молодых клеточных форм.

*Характеристика цитоплазмы* включает в себя: определение ее *объема* (обильная, умеренная, скудная); *цвета* (голубого, серого, серо-голубого, розового, розово-фиолетового и др.); *окраски* (равномерной или неравномерной); наличием *включений* (зерна, пылевидная зернистость, пеннистая цитоплазма и др.); признаков *секреции*; четкости границ (четкие, не ровные, сливаются с фоном); *вакуолизации*.

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию мазка-отпечатка, произвести его цитологический анализ.**



**Задания:**

1. отработать методику взятия крови у рыбы;
2. отработать методику приготовления и окрашивания мазка крови;
3. отработать методику приготовления и окрашивания мазка-отпечатка;
4. провести дифференциальный цитологический анализ клеток крови по мазку и оформить результаты анализа в рабочей тетради;
5. провести дифференциальный цитологический анализ клеточного состава в мазке-отпечатке и оформить результаты анализа в рабочей тетради.

**Контрольные вопросы:**

1. объяснить значение гепарина в методике изготовления мазков крови;
2. раскрыть понятие «фиксатор» и объяснить его значение;
3. перечислить необходимые реактивы для окрашивания мазков и мазков отпечатков;
4. перечислить основные параметра использующиеся для цитологического анализа;
5. объяснить значение параметра «фон препарата» при цитологическом анализе;
6. объяснить значение параметра «количество клеток» при цитологическом анализе;
7. объяснить значение параметра «расположение клеток» при цитологическом анализе;
8. объяснить значение параметра «размеры и форма клеток» при цитологическом анализе;
9. объяснить значение параметра «форма ядра» при цитологическом анализе;
10. объяснить значение параметра «размеры ядра» при цитологическом анализе;
11. объяснить значение параметра «расположение ядра» при цитологическом анализе;
12. объяснить значение параметра «количество ядра» при цитологическом анализе;
13. объяснить значение параметра «окрашиваемость ядра» при цитологическом анализе;

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию пленочного препарата, произвести его цитологический анализ.**

14. объяснить значение параметра «ядерно-цитоплазматическое отношение» при цитологическом анализе;
15. объяснить значение параметра «характеристика хроматина» при цитологическом анализе;
16. объяснить значение параметра «характеристика хроматина» при цитологическом анализе;
17. объяснить значение параметра «характеристика ядрышка» при цитологическом анализе;
18. объяснить значение параметра «пролиферативная активность» при цитологическом анализе;
19. объяснить значение параметра «характеристика цитоплазмы» при цитологическом анализе;

### **Занятие 3. Освоение методики изготовления пленочного препарата (4 часа).**

**Оборудование и реактивы:** ножницы, препаровальные иглы, предметные стекла, гематоксилин Маера.

#### **Методика изготовления и окрашивания пленочного препарата:**

1. выделить у рыбы брыжейку и поместить в чашку Петри с дистиллированной водой;
2. слить воду, расправить брыжейку и подкрасить ее гематоксилином Майера (2-3 минуты), промыть в проточной воде (2-3 минуты);
3. пленку достать и расправить на предметном стекле.

#### **Задания:**

1. изготовить и окрасить пленочный препарат;
2. произвести цитологический анализ клеточного состава в пленочном препарате;
3. результаты цитологического анализа оформить в рабочей тетради.

#### **Контрольные вопросы:**

1. перечислить виды препаратов используемых для цитологического анализа;
2. назвать отличительные признаки мазка, мазка-отпечатка, первичной культуры клеток *in vitro*;
3. перечислить требования, предъявляемые к препарату для микроскопии в проходящем свете;
4. охарактеризовать физические методы фиксации;
5. охарактеризовать химические методы фиксации;

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию гистологического препарата, произвести его анализ.**

6. перечислить последовательность этапов работы по визуализации и анализу изображения с помощью комплекса оптико-структурного анализа;

7. раскрыть основные преимущества и недостатки витального метода изучения живых объектов;

8. раскрыть основные преимущества и недостатки метода изучения фиксированных объектов.

#### **Занятие № 4. Методика изготовления гистологического среза (6 часов).**

##### **Теоретический минимум**

##### **Обезвоживание и уплотнение**

Образцы уплотняют (придают им пластичность) для того, чтобы в дальнейшем производить срезы на микротоме. Обычно в качестве уплотнителя используют парафин или целлоидин. До уплотнения образцы обезвоживают, так как гидрофобный уплотнитель не проникает в ткань. Дегидратация достигается проведением образцов через ряд спиртов возрастающей концентрации – 60<sup>0</sup>, 70<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 96<sup>0</sup>, и абсолютный – 100<sup>0</sup> спирт, где они окончательно утрачивают воду.

##### **Заливка в парафин**

После дегидратации образцов в спиртах их переносят в смесь равных частей ксилола и абсолютного спирта, а затем в чистый ксилол. Далее образцы погружают в насыщенный раствор парафина в ксилоле (в термостате при температуре 37<sup>0</sup> С), а затем переносят в чистый расплавленный парафин (в термостате при температуре 52-56<sup>0</sup> С). Для окончательной заливки образцов парафин наливают в формочки куда предварительно переносят образцы. После затвердевания парафина из него последовательно вырезают образцы, заключенные в парафин, теплым шпателем придают им прямоугольную форму и монтируют на деревянные бруски. Полученная конструкция называется блоком.

##### **Изготовление срезов**

Для получения срезов используют специальный прибор – микротом. В нем выделяют три основные части:

1. **объектодержатель** – для закрепления блока;
2. **микрометрическая механическая система** подачи объектодержателя с блоком на заданную величину (требуемая толщина среза в микронах);

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию гистологического препарата, окрашенного гематоксилином и эозином, обозначить базофильные и оксифильные структуры клетки.**

3. **держатель ножа** – для закрепления микротомного ножа.

Работу на санном микротоме начинают с закрепления ножа в салазках и блока в объектодержателе. Закрепленный блок поднимают на высоту, соответствующему микротомному ножу. Регулируя левой рукой высоту подъема блока, правой рукой передвигая салазки с ножом, добиваются касания ножа поверхности блока. Дальнейший подъем блока производится с помощью микровинта, связанного с объектодержателем. Для этого на микровинте имеется шкала, которой регулируется высота подъема блока. Устанавливая на шкале определенное количество делений, можно регулировать толщину срезов. Полученные срезы с помощью кисточки снимают с микротомного ножа и приклеиваются смесью белка с глицерином (1:1) на предметные стекла.

Перед окрашиванием образцы освобождаются от парафина путем проводки по батарее растворителей: Ксилол I, ксилол II, спирт 96 %, 80 %, 70 %, 60 %, вода (по 2-5 мин).

Этот ряд кончается водой в том случае, если затем используется водорастворимый краситель.

### **Окрашивание**

Окрашивание позволяет выявлять внутриклеточные структуры, обладающие повышенным сродством к определенным красителям. Красители – это относительно низкомолекулярные органические вещества, обладающие повышенным сродством к определенным химическим компонентам клетки.

Все красители, используемые в гистологической технике, подразделяются на 3 типа:

**Основные красители** представляют собой соли красящих оснований. Структуры, избирательно окрашивающиеся основными красителями, называются *базофильными*. К основным красителям относят, например: гематоксилин, толуидиновый синий, азур 2, кармин, сафронин, метиленовый зеленый, галлоцианин. Эти красители окрашивают структуры, богатые нуклеиновыми или иными кислотами, например: ядро клетки, рибосомы, некоторые компоненты межклеточного вещества.

**Кислые красители** при окрашивании взаимодействуют с основными группами, в результате чего образуются специфические соединения. Структуры, окрашивающиеся кислыми красителями, называют *оксифильными*. К кислым красителям относят, например: эозин, кислый фуксин, конго красный, пикриновую кислоту. Эти красители обычно

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию гистологического препарата, окрашенного по Маллори, обозначить клетки и волокна межклеточного вещества.**



используют для окрашивания белковых компонентов цитоплазмы и некоторых волокнистых компонентов межклеточного вещества.

**Нейтральные красители** – представляют собой солеобразующие соединения кислых и основных красителей. Примером может являться смесь двух красителей – **основного** (азур 2) и **кислого** (эозин). Используются для выявления специфических гранул в эозинофильных лейкоцитах.

Существуют специальные красители, которые используются для выявления определенных структур, имеющих характерный химический состав. Например, жировые включения окрашиваются суданом III в красно-оранжевый цвет. Такие красители называют **индифферентными**.

Для окрашивания предметные стёкла со срезами:

- помещают на короткое время в раствор красителя;
- промывают водой;
- обрабатывают раствором другого красителя (если таковой используется);
- вновь промывают водой.

После окрашивания срезы:

- обезвоживают (проводя по батарее спиртов с возрастающей концентрацией);
- просветляют (в карбол/ксилоле и ксилоле);
- срезы заключают в канадский бальзам и накрывают покровным стеклом.

**Методика окрашивания гематоксилином и эозинном:**

1. окрасить депарафинированные срезы гематоксилином Бемера – 2 минуты;
2. промыть в проточной воде – 2 минуты;
3. окрасить эозином – 1 минута;
4. обезводить срез в спиртах возрастающей концентрации, просветлить в карбол/ ксилоле (1:1) – 1 минута, ксилол 1, 2 – по 1 минуте;
5. заключить срез в канадский бальзам под предметное стекло.

**Результат:** нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) окрашиваются в фиолетовый цвет (базофильно); белки цитоплазмы - в розовый цвет (оксифильно).

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию гистологического препарата, окрашенного альциановым синим, обозначить распределение кислых гликозаминогликанов в клетке и межклеточном веществе.**

### **Задания:**

1. зарисовать в рабочей тетради схему проводки материала, изготовления и окрашивания гистологического среза;
2. изготовить и окрасить гистологический срез;
3. произвести цитологический анализ клеточного состава среза;
4. полученные результаты цитологического анализа оформить в рабочей тетради.

### **Контрольные вопросы:**

1. раскрыть понятие «взятие материала» и перечислить предъявляемые к нему требования;
2. перечислить требования, предъявляемые к фиксатору;
3. раскрыть понятие «артефакт» и объяснить его значение при цитологическом анализе препарата;
4. перечислить последовательность этапов проводки материала;
5. объяснить назначение микротомов и назвать его основные узлы;
6. перечислить последовательность действий при работе с микротомом;
7. перечислить последовательность действий при подготовке монтирования среза на предметное стекло;
8. объяснить назначение батареи для депарафинирования среза;
9. перечислить классификацию красителей;
10. раскрыть понятие «базофилия» и объяснить её значение при проведении цитологического анализа;
11. раскрыть понятие «оксифилия» и объяснить её значение при проведении цитологического анализа;
12. перечислить последовательность действий после окрашивания препарата до его заключения в консервирующую среду;
13. объяснить назначение заключения среза в консервирующую среду назвать основные виды консервирующих сред.
14. преимущества и недостатки существующих консервирующих сред.

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию гистологического препарата, окрашенного реактивом Шиффа, обозначить включения гликогена в клетке.**

### **Тема 3. Методы цитохимических исследований (24 часа).**

Цитохимические методы позволяют определять содержание и локализацию специфических соединений в клетке с помощью химических реактивов, которые взаимодействуют с реактивными группами выявляемых соединений. Это приводит к образованию новых соединений и регистрируется по изменению цвета исходного красителя/красителей.

**Место проведения занятия:** лаборатория морфологии.

**Цель занятия:** освоение методов гистохимических исследований важнейших органических соединений в клетке и неклеточном веществе.

#### **Задачи:**

1. освоить методы выявления нуклеиновых кислот;
2. освоить методы выявления углеводов и белково-углеводных соединений;
3. освоить метод выявления внеклеточных структур;
4. освоить метод выявления митохондрий;
5. освоить метод опсоно-фагоцитарной реакции;
6. освоить метод дифференциального окрашивания клеток рыхлой соединительной ткани;
7. освоить методы выявления полового хроматина;
8. освоить методы выявления политенных хромосом.

*Занятие 1.* Освоение методики выявления РНК и ДНК (4 часа).

*Занятие 2.* Освоение методики выявления гликогена и гликопротеидов (2 часа).

*Занятие 3.* Освоение методики выявления кислых гликозаминогликанов (2 часа)

*Занятие 4.* Освоение методики выявления коллагена по Маллори (2 часа).

*Занятие 5.* Освоение методики выявления митохондрий по Альтману (2 часа)

*Занятие 6.* Освоение методики постановки опсоно-фагоцитарной реакции (4 часа).

*Занятие 7.* Освоение методики дифференциального окрашивания клеток рыхлой соединительной ткани. Методика выявления полового хроматина (4 часа).

*Занятие 8.* Освоение методики выявления политенных хромосом (4 часа).

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию гистологического препарата, окрашенного по Фельгену и Браше, определить локализацию ДНК и РНК в клетке.**

### **Занятие 1. Освоение методики выявления нуклеиновых кислот (4 часа).**

Стереохимическим фактором, определяющим высокое сродство молекулы ДНК к метилового зеленого является присутствие в молекуле отрицательно заряженных фосфатных остатков, расстояние между которыми соответствует расстоянию между двумя положительными зарядами в молекуле метилового зеленого.

#### **Методика выявления ДНК и РНК по Браше:**

1. окрасить депарафинированные срезы раствором – А+Б \* (30мин.);
2. быстро промыть срезы дистиллированной водой (2-3 сек.);
3. промокнуть срезы фильтровальной бумагой;
4. быстро провести по батарее растворов: 100<sup>0</sup> ацетон, ацетон/ксилол, 10% раствор ацетона в ксилоле, ксилол 1, ксилол 2;
5. заключить срезы в канадский бальзам.

**Результат:** РНК ядрышек и цитоплазма – ярко-красного цвета, ДНК – зеленого цвета;

#### **Приготовление растворов:**

Раствор А. Смешать 17,5 мл 5% водного раствора пиронина с 10 мл 2% водного раствора метилового зеленого и 250 мл дистиллированной воды. Раствор Б представляет собой 0,5 молярный ацетатный буфер (рН 4,8)

Пред употреблением растворы А и Б смешивают 1:1.

**Результат:** ядерный хроматин ДНК окрашивается в зеленый, сине-зеленый или пурпурно-зеленый цвет, РНК – в красный.

### **Методика выявления ДНК по Фельгену-Россенбеку**

Это классический метод выявления ДНК основан на том, что в результате мягкого гидролиза под влиянием 1н раствор HCl в фиксированных препаратах происходит отщепление пуриновых оснований. Образующиеся при этом реакционноспособные альдегидные группы дают с реактивом Шиффа кислотостойкий краситель – от красного до фиолетово-красного цвета. Для гистохимического выявления ДНК имеет значение тот факт, что при точном соблюдении условий гидролиза фосфатные мостики дезоксирибозы не разрушаются: все соединения не теряют кислотного характера и сохраняют нерастворимость. Образование альдегида из рибозы РНК в результате кислого гидролиза не происходит, поскольку при этой процедуре РНК полностью вымывается из среза.

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию гистологического препарата, окрашенного гематоксилином и эозином, обозначить базофильные и оксифильные структуры клетки.**



**Реактивы:** 1н раствор HCl, реактив Шиффа, сернистая вода.

**Методика выявления ДНК:**

1. депарафинированные срезы помещают для гидролиза в 1 н HCl при 60<sup>0</sup>С в течение 20 мин.;
2. срезы переносят в дистиллированную воду для прекращения гидролиза, быстро споласкивают в соляной кислоте;
3. срезы обрабатывают реактивом Шиффа 60 мин.;
4. не споласкивая срезы водой, их помещают последовательно в 3 порции сернистой воды на 2 мин. в каждой;
5. срезы промыть в проточной и дистиллированной воде по 10-15 мин.;
6. окрасить цитоплазму светлым зеленым (1% раствор светлого зеленого в 96% спирте) 1-2 мин.;
7. обезвоживание срезов в спиртах, просветление в ксилоле и заключение в бальзам.

**Результат:** ДНК окрашивается в пурпурно-красный цвет, цитоплазма – в зеленый.

**Занятие 2. Освоение методики выявления гликогена и гликопротеидов (2 часа).**

Этим методом выявляют соединения, содержащие оксигруппы, которые в результате окисления метайодной кислоты могут превращаться в альдегидные группы. В срезах с помощью ШИК-реакции выявляют гликоген и гликопротеиды. Интенсивность реакции зависит от количества реакционноспособных гликолевых групп, первоначально присутствующих в соответственных тканях.

Для получения стабильных результатов необходимо пользоваться химически чистой посудой, исключая контакт срезов с металлическими инструментами.

**Методика постановки ШИК-реакции:**

1. одновременно депарафинировать и довести до воды два среза;
2. один срез обработать раствором панкреатической амилазы в течение 30 мин в термостате при 37<sup>0</sup> С;
3. оба среза погрузить в раствор перйодата калия на 30 мин;
4. тщательно промывают в дистиллированной воде;
5. быстро ополоснуть в трех порциях сернистой воды;
6. промыть в дистиллированной воде;
7. окрасить ядра клеток гематоксилином Майера 5 мин;
8. помыть в водопроводной воде 3 мин;5.

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию хромосом, определить их характерные морфологические признаки.**

9. провести по батарее спиртов, через ксилол 1, ксилол 2, и минуя карбол/ксилол заключить срезы в канадский бальзам.

**Результат:** интенсивно окрашенные в цитоплазме гранулы красного цвета можно считать гликогеном, если положительная ШИК-реакция отсутствует в срезах, предварительно обработанных амилазой. Вещества, интенсивность окрашивания которых реактивом Шиффа не изменяется после предварительной обработки срезов амилазой, являются гликопротеидами.

### **Занятие № 3. Освоение методики выявления кислых гликозаминогликанов (ГАГ) (2 часа)**

Реакция альцианового синего с реакционными группами субстрата основана на свойстве молекул красителя взаимодействовать с отрицательно заряженными группами субстрата и располагаться перпендикулярно к продольной оси. Если содержание ГАГ в исследуемых структурах низкое, перед окраской проводят карбоксиметилирование. Алкилирование, происходящее по воздействию метилиодида блокирует все карбоксильные группы, оставляя неизменными сульфатные, что улучшает качество реакции.

#### **Методика выявления кислых гликозаминогликанов по Стивдену:**

1. депарафинированные срезы довести до воды.
2. нанести 0,1% раствор альцианового синего на 10 мин.
3. промыть в дистиллированной воде.
4. окрасить гематоксилином Майера 3-5 мин.
5. промыть в водопроводной воде 2-3 мин.
6. провести по батарее спиртов, через ксилол 1, ксилол 2, и минуя карбол/ксилол заключить срезы в канадский бальзам.

**Результат:** кислые ГАГ окрашиваются в сине-голубой цвет.

### **Занятие 4. Освоение методики выявления коллагена по Маллори (2 часа).**

Избирательность метода обусловлена специфическим связыванием молибденовой кислоты с коллагеновыми волокнами с последующим присоединением обычных сульфированных красителей.

#### **Методика выявления коллагена по Маллори:**

1. депарафинированные срезы довести до воды;
2. окрасить 0,1% раствором кислого фуксина -3 мин;
3. промыть в дистиллированной воде и зафиксировать окраску 1% раствором фосфорно-молибденовой кислоты;

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию политенных хромосом, отметить их характерные морфологические признаки.**

4. промыть в дистиллированной воде
5. окрасить сложным красителем в течение 2 мин\*;
6. промыть в дистиллированной воде;
7. дифференцировать в 96<sup>0</sup> спирте;
8. провести по батарее – абсолютный спирт, ксилол 1, ксилол 2, заключить в бальзам.

**Результат:** коллагеновые и ретикулиновые волокна темно-синие, слизь синяя, эритроциты красно-оранжевые, мышечная ткань ярко-оранжевая, хроматин красный или тёмно-коричневый.

**Приготовление рабочего раствора красителя:** к 0,5 г анилинового синего + 2 г оранжевого + 2 г щавелевой кислоты и растворить в 10 мл дистиллированной воды. Прокипятить, остудить и профильтровать.

### **Занятие № 5. Освоение методики выявления митохондрий по Альтману (2 часа).**

#### **Методика выявления митохондрий по Альтману:**

1. депарафинированные срезы довести до воды;
2. нанести в избытке готовый раствор кислотного фуксина на анилиновой воде;
3. нагреть стекло над пламенем спиртовки до появления паров и остудить. Эту операцию повторяют 1-2 раза; после окончательного охлаждения избыток раствора красителя слить;
4. дифференцировать в трех порциях пикриновой кислоты;
5. провести по батарее – 96<sup>0</sup>, абсолютный спирт, ксилол 1, ксилол 2 и минуя карбол/ксилол заключить в бальзам.

**Результат:** митохондрии – резко красные на желтоватом фоне.

*Примечания.* Наибольшую трудность представляет дифференцировка в пикриновой кислоте. Если она прервана слишком рано, то митохондрии и протоплазма остаются окрашенными в одинаковый красный цвет; если она прервана слишком поздно, то митохондрии уже недостаточно выделяются на фоне обесцветившейся протоплазмы.

**Приготовление раствора красителя.** В 100 см<sup>3</sup> анилиновой воды растворяют в 20 г кислого фуксина, так как стойкость раствора очень ограничена (около 24 час), то лучше готовить лишь 10 см<sup>3</sup>.

*Раствор I:* пикриновая кислота, насыщенная на абсолютном спирте 10 см<sup>3</sup>, 20-градусный спирт 40 см<sup>3</sup>. *Раствор II:* пикриновая кислота, насыщенная на абсолютном спирте 10 см<sup>3</sup>, 20-градусный спирт 70 см<sup>3</sup>. Первым раствором наполняют два стаканчика: один, чтобы смыть избыток раствора красителя (около 15 сек.); второй для следующей за этим диффе-

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию первичной культуры клеток, окрашенную по Альтману, обозначить локализацию митохондрий в клетке.**

ренцировки. Дифференцировку заканчивают в третьем стаканчике с раствором II (1-3 мин.)

### **Занятие 6. Освоение методики постановки опсоно-фагоцитарной реакции (4 часа).**

Предварительного готовится суточная культура *E. Coli* штамма 0-78.

Реакция проводится с использованием лабораторных животных.

#### **Методика постановки опсоно-фагоцитарной реакции:**

1. зафиксировать крысу и с помощью предварительно гепаринизированного шприца забрать 1 мл крови из хвостовой вены;
2. кровь перенести в пробирку и добавить 0,2 мл взвеси суточной культуры *E. Coli* штамма 0-78 исходной концентрации (1 млрд./мл);
3. содержимое пробирки осторожно перемешать и поставить в термостат для инкубирования при  $t\ 37^{\circ}\text{C}$  в течение 30, 60, 90, 120 мин;
4. для анализа произвести забор из пробирки небольшого количества крови (примерно 150 мкл) через 30, 60, 90, 120 мин и приготовить мазок;
5. мазок высушить при комнатной  $t$  в течение 5 мин;
6. зафиксировать этанолом или коммерческим Маем-Грюнвальдом в течение 15 мин;
7. быстро сполоснуть в дистиллированной воде, просушить фильтром;
8. микроскопировать под иммерсией.

**Результат:** в цитоплазме нейтрофилов идентифицируются бактерии *E. coli*. палочковидной формы с утолщениями в концевых отделах.

Мазки изучить под микроскопом с использованием иммерсии и произвести расчет показателей фагоцитоза. Для этого в окрашенных мазках из найденных 100 фагоцитов (нейтрофилов и моноцитов) определить число клеток, участвующих в фагоцитозе (захвативших определенное количество микробов). Вычислить *фагоцитарный индекс Гамбургера* (ФИ) — процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа.

В каждой фагоцитирующей клетке учесть число поглощенных микробов и вычислить среднее число бактерий, захваченных одним фагоцитом — *фагоцитарное число Райта* (ФЧ) (общее число захваченных микробов, поделенное на количество фагоцитирующих клеток).

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию первичной культуры клеток, гематоксилином и эозином, обозначить локализацию мембранных органелл в клетке.**



Необходимо отметить состояние деградации *E. coli* в каждой фагоцитирующей клетке, которое оценивается по характеру окраски, величине и степени набухания микробов.

#### **Критерии деградации:**

*1 степень* – микробная клетка четко контурирована, размеры не увеличены, окраска базофильная – клетка не подвергнута перевариванию;

*2 степень* – клетка слегка или сильно увеличена, набухшая, но контуры тела сохранены, окраска нейтральная или оксифильная, имеются отдельные просветления – микроб подвергся действию ферментов фагоцитов;

*3 степень* – клетка сильно набухшая, почти полностью переваренная, без очертаний, имеет вид детрита.

*Индекс бактерицидности фагоцитов* (индекс завершенности фагоцитоза в момент исследования), который характеризует способность фагоцита переваривать захваченный микроб. Определяется по отношению числа микробов, находящихся во второй и третьей стадиях разрушения, к общему числу захваченных фагоцитами микробов по следующей формуле:

$$\text{ИБФ} = \frac{Ч_y}{Ч_n} \times 100$$

Ч<sub>у</sub> – число убитых внутри фагоцитов микробов;

Ч<sub>п</sub> – общее число поглощенных фагоцитами микробов.

### **Занятие 7. Освоение методики дифференциального окрашивания клеток рыхлой соединительной ткани. Методика выявления полового хроматина (4 часа).**

#### **Методика выявления полового хроматина (тельца Барра):**

1. произвести кюреткой соскоб со слизистой оболочки рта;
2. соскоб поместить на предметное стекло в каплю абсолютного спирта и высушить при комнатной t в течение 5-10 мин;
3. окрасить гематоксилином Майера 5 мин;
4. нанести пипеткой водопроводную воду на 1 мин;
5. удалить воду фильтровальной бумагой;
6. окрасить водным раствором 0,5% эозина 10 сек;
7. убрать краситель фильтровальной бумагой;
8. нанести на 1 мин 96<sup>0</sup> спирт, после чего удалить фильтровальной бумагой;

**Используя комплекс визуализации и анализа изображения получить и разместить фотографию мазка крови после постановки опсонофагоцитарной реакции, обозначить локализацию бактерий в клетке, рассчитать показатели фагоцитарного числа, фагоцитарного индекса, индекса завершенности фагоцитоза.**

9. нанести на 1 мин ксилол, а затем удалить фильтровальной бумагой;
10. заключить в канадский бальзам.

**Результат:** около ядрышка выявляется плотное тельце, которое представляет собой половую X-хромосому, которая не деспирализуется после митоза.

### **Занятие № 8. Освоение методики выявления политенных хромосом (4 часа).**

1. Крупную личинку комара-дергуна (в быту ее называют мотыль) поместить на предметное стекло;
2. срезать препаровальной иглой головной членик вместе с головным отделом, придерживая личинку второй иглой;
3. из следующего членика выдавить его содержимое лёгким нажимом иглы, при этом вываливаются две маленькие слюнные железы, похожие на виноградные гроздья;
4. на препарат наносят физиологический раствор для хладнокровных и накрывают покровным стеклом;
5. микроскопировать при увеличении 400 x при опущенном конденсоре.

**Результат:** в клетках слюнной железы видно крупное ядро с хромосомами, которые имеют вид широких лент, поперечно исчерченных тёмными полосками – дисками, чередующимися со светлыми зонами. Темные полосы образованы ДНК, светлые – белковыми молекулами. Количество хромосом четыре, ядрышко лежит на одной из хромосом в области ядрышкового организатора. Хромосомы образованы тысячами параллельно расположенных хромосомных нитей, идущих продольно и называемых политенными. Такое количество нитей хромосом образовано вследствие многократных эндомитозов. Удваивающиеся перед митозом хромосомные нити не получают возможности разойтись в дочерние клетки и остаются в одной клетке, составляя одну большую хромосому. Ядрышко имеет вид прозрачного пузырька и представляет собой участок, где хромосомы сильно деспирализованы и образуют «пуф» - вздутие. Это место активного образования РНК.

## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акмаев И.Г. Руководство по гистологии. / И.Г. Акмаев, В.Л. Быков, О.В. Волков. – С-Пб.: СпецЛит, 2001.
2. Афанасьева Ю.И. Гистология, цитология и эмбриология./ Ю.И. Афанасьева, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский. – М.: Медицина, 2001.
3. Егорова О. В. С микроскопом на «ты». Шаг в XXI век. / О. В Егорова.- М., 2006.
4. Жаров А.В. Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях (диагностика, исследование сырья и продукции) / А.В. Жаров // Методическое руководство. М.: Московская академия ветеринарной медицины и биотехнологии, 2003.
5. Козловская Л.В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. – 2-е изд. / Л.В. Козловская, А.Ю. Николаев – М.: Медицина, 1984.
6. Кузнецов С.Л. Руководство-атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии Диаморф. / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров, В.Л. Горячкина // Учебное пособие для медицинских ВУЗов, 2002.
7. Семченко В.В. Гистологическая техника: учебное пособие. – 2-е изд., стереотип./ В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.Н. Артемьев – Омск: Омская медицинская академия, 2003.

## РЕСУРСЫ СЕТИ INTERNET

1. [http:// www.anatomy.univr./hypercell.html](http://www.anatomy.univr./hypercell.html)
2. <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/cb/cbdir.html>
3. [http://www.biology.arizona.edu/cell\\_bio/cell\\_bio.html](http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/cell_bio.html)
4. <http://www.cellsalive.com>.

## Содержание

|   |    |
|---|----|
| Тема 1. Устройство и правила работы со световым микроскопом.<br>Методы световой микроскопии .....   | 3  |
| Тема 2. Методы изготовления микроскопических препаратов,<br>визуализации и анализа изображения объектов.....                                    | 13 |
| Занятие 1. Освоение методики витального изучения живых<br>организмов, визуализации и анализа изображения.....                                   | 17 |
| Занятие 2. Освоение методик изготовления, окрашивания<br>и цитологического анализа мазка, мазка-отпечатка.....                                  | 19 |
| Занятие 3. Освоение методики изготовления пленочного<br>препарата .....   | 27 |
| Занятие 4. Методика изготовления гистологического среза.....  | 29 |
| Тема 3. Методы цистохимических исследований.....  | 37 |
| Занятие 1. Освоение методики выявления нуклеиновых кислот.....  | 39 |
| Занятие 2. Освоение методики выявления гликогена<br>и гликопротеидов.....   | 41 |
| Занятие 3. Освоение методики выявления кислых<br>гликозаминогликанов (ГАГ).....   | 43 |
| Занятие 4. Освоение методики выявления коллагена<br>по Маллори.....   | 43 |
| Занятие 5. Освоение методики выявления митохондрий<br>по Альтману.....  | 45 |
| Занятие 6. Освоение методики постановки опсоно-фагоцитарной<br>реакции .....  | 47 |
| Занятие 7. Освоение методики дифференциального окрашивания<br>клеток рыхлой соединительной ткани. Методика выявления<br>полового хроматина..... | 49 |
| Занятие 8. Освоение методики выявления политенных<br>хромосом .....   | 51 |
| Рекомендуемая литература.....   | 52 |

Учебное издание

Сахаров Андрей Валентинович  
Макеев Александр Александрович

РУКОВОДСТВО  
К ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО БИОЛОГИИ КЛЕТКИ

Учебно-методическое пособие  
В авторской редакции

Компьютерный набор А.А. Макеев

Лицензия ЛР № 020059 от 24.03.97  
Гигиенический сертификат № 54.нк.05.953.н.000149.12.02  
от 27 декабря 2002 г.

Подписано к печати 17.04.2008. Печать офсетная. Бумага офсетная.  
Формат 60x84/16. Усл. и. л. 3,5. Тираж 100 экз. Заказ № 97.

Новосибирский государственный педагогический университет  
630126, Новосибирск, ул. Виллюйская, 28

Отпечатано в типографии ГЦРО  
630064, Новосибирск, пр. Маркса, 21