

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН**

**ТАШКЕНТСКИЙ ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИНСТИТУТ**

«УТВЕРЖДАЮ»

**Проректор по учебной работе,
профессор К. Н. Хаитов**

« _____ » 2021 года



**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ
ПО ГИСТОЛОГИИ, ЦИТОЛОГИИ, ЭМБРИОЛОГИИ**

Учебно-методическое пособие для студентов 1-2 курсов педиатрического, медико-педагогического, лечебного и медико-биологического факультетов медицинских вузов

Ташкент 2021

Составители:

- 1. Закирова Наргиза Баходировна** – доцент кафедры гистологии, патологической физиологии ТашПМИ, д.м.н.
- 2. Муротов Облокул Уматович** – старший преподаватель кафедры гистологии, патологической физиологии ТашПМИ
- 3. Нигматова Гулюз Рустамовна** – ассистент кафедры гистологии, патологической физиологии ТашПМИ
- 4. Хамдамов Джахонгир Олимович** – ассистент кафедры гистологии, патологической физиологии ТашПМИ
- 5. Маливская Лилия Павловна** – ассистент кафедры гистологии, патологической физиологии ТашПМИ

Рецензенты:

- 1. Тухтаев Кадир Рахимович** – профессор кафедры гистологии и медицинской биологии ТМА
- 2. Рахматова Мукаддас Холтаевна** – заведующая кафедры гистологии и медицинской биологии ТГСИ, доцент, д.м.н..

Учебно–методическое пособие утверждено на центральном методическом совете ТашПМИ от “___” _____2021 года, протокол № ___.

ВВЕДЕНИЕ

Проведение лабораторных исследований, а также анализ полученных данных считается очень тонкой работой. Для получения достоверной информации необходимо следовать правилам сбора материалов для исследования, их консервации и хранения до проведения самого исследования. Таким образом, врачи, магистры и работники лаборатории должны быть в равной степени заинтересованы в качестве лабораторных исследований и анализе результатов на соответствие эталонным критериям.

Данное учебно-методическое пособие предназначено как базовая литература и практическое руководство для студентов 1 и 2 курсов педиатрического, медико-педагогического и медико-биологического факультетов медицинских вузов при изучении курса «Гистология, цитология и эмбриология».

В пособии представлены основные методы гистологической диагностики тканей и органов для студентов и магистров. Пособие включает блок теоретического материала, порядок пошагового проведения гистологических исследований, а также анализ гистологических препаратов.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

№	Тема и содержание занятия	Практическая часть	Часы	Наименование оборудования, инструментов и др., необходимых для формирования практических навыков и умений, указанных в квалификационных требованиях
1	Микротехника. I часть.	Введение электронной микроскопии в гистологию, ее роль в науке, методы работы.	4	Биноккулярный микроскоп с камерой (Италия), микроскоп БИОМЕД, микротом, реагенты (гематоксилин, эозин, бальзам Канадский, формалин, парафин, предметное стекло, покровное стекло и др.), прибор для определения группы крови, прибор для подсчета клеток крови. Посуда разных размеров, термостат, рН-метр, аквадистиллятор, холодильник, морозильная камера-40С.
2	Микротехника. II часть.	Методики приготовления гистологических препаратов. Этапы, методы окрашивания и диагностика препаратов	4	Биноккулярный микроскоп с камерой (Италия), микроскоп БИОМЕД, микротом, реагенты (гематоксилин, эозин, бальзам Канадский, формалин, парафин, предметное стекло, покровное стекло и др.), прибор для определения группы крови, прибор для подсчета клеток крови. Посуда разных размеров, термостат, рН-метр, аквадистиллятор, холодильник, морозильная камера-40С.
3	Метод взятия крови. I часть.	Метод взятия крови из пальца.	4	Биноккулярный микроскоп с камерой (Италия), микроскоп БИОМЕД, микротом, реагенты (гематоксилин, эозин, бальзам Канадский, формалин, парафин, предметное стекло, покровное стекло и др.), прибор для определения группы крови, прибор для подсчета клеток крови. Посуда разных размеров, термостат, рН-метр, аквадистиллятор, холодильник, морозильная камера-40С.
4	Метод взятия крови. II часть.	Идентификация кровяных элементов под микроскопом.	4	Биноккулярный микроскоп с камерой (Италия), микроскоп БИОМЕД, микротом, реагенты (гематоксилин, эозин, бальзам Канадский, формалин, парафин, предметное стекло, покровное стекло и др.), прибор для определения группы крови, прибор для подсчета клеток крови. Посуда разных размеров, термостат, рН-метр, аквадистиллятор, холодильник, морозильная камера-40С.
5	Диагностика гистологических препаратов под микроскопом.	Диагностика материалов биопсии печени и желудка под микроскопом.	4	Биноккулярный микроскоп с камерой (Италия), микроскоп БИОМЕД, микротом, реагенты (гематоксилин, эозин, бальзам Канадский, формалин, парафин, предметное стекло, покровное стекло и др.), прибор для определения группы крови, прибор для подсчета клеток крови. Посуда разных размеров, термостат, рН-метр, аквадистиллятор, холодильник, морозильная камера-40С.
Всего:			20	

Тема: МИКРОТЕХНИКА

МОДЕЛЬ ОБУЧЕНИЯ

Время: по графику (мин.)	Количество обучающихся: 14
Место проведения занятия	Учебная комната кафедры гистологии
Структура учебного занятия	1. Введение 2. Теоретическая часть. 3. Практическая часть.
Цель занятия: ознакомление с содержанием основных этапов изготовления фиксированного и окрашенного гистологического препарата; - получить представление о тинкториальных свойствах структур в гистологическом препарате; - познакомиться с принципами работы и использовании приборов специальной микроскопии в исследовательских целях; - закрепить навык микрофотографирования гистологического препарата.	
Студент должен знать: - основные принципы приготовления гистологического препарата.	
Студент должен уметь: - овладеть основными методиками приготовления фиксированных и окрашенных препаратов клеток, тканей и органов для световой микроскопии; - работой на микротоме. - овладеть навыком работы со световым микроскопом.	
<u>Задачи педагога:</u> - проверить теоретические знания студентов об этапах приготовления гистологических препаратов для световой и электронной микроскопии; - объяснить правила работы со световым микроскопом.	<u>Результаты учебной деятельности:</u> - знают этапы приготовления гистологических препаратов для световой и электронной микроскопии; - правильно работают со световым микроскопом
Методы и техники обучения	Интерактивный метод «Пчелиный рой», органайзер «Кластер», таблицы, решение ситуационных задач.
Формы обучения	Работа коллективная и в группах, презентации.
Оснащение обучения	Учебная литература, тексты лекций, раздаточный материал, баннер, гистологические атласы, компьютер, микроскопы, микропрепараты, видеофильмы, доска, мел.
Мониторинг и оценка	Устно, письменно, выполнение учебных заданий в группах, ситуационные задачи.

Критерии оценки текущего контроля

Усвоение (%, балл)	Оценка	Степень знания студента
96-100	«5» отлично	<p>Ответ студента по теме занятия полный, обогащен дополнительными сведениями из различных источников, объем знаний выходит за пределы программы. Усвоил предложенные основные литературные источники по программе и знаком с дополнительной литературой.</p> <p>Вовремя и качественно выполняет задания по занятию.</p> <p>При решении ситуационных задач логически мыслит, отвечает четко и обоснованно. Активно участвует в обсуждении темы и в дискуссиях, отстаивает своё мнение. Объединяет знания, полученные на анатомии, нормальной физиологии и биохимии, может самостоятельно принимать выводы и решения. Активно и творчески участвует в интерактивных играх, на все вопросы полностью отвечает, ответы обосновывает.</p>
91-95	«5» отлично	<p>Ответ студента по теме занятия полный, объем знаний в пределах программы, отвечает обоснованно и уверенно. Усвоил предложенные основные литературные источники по программе и знаком с дополнительной литературой. Вовремя и качественно выполняет заданные задания по занятию. Ситуационные задачи решает четко и обоснованно. Активно участвует в обсуждении темы и в дискуссиях, защищает свои идеи. Активно и творчески участвует в интерактивных играх.</p>
86-90	«5» отлично	<p>Ответ студента по теме занятия полный, объем знаний в пределах программы, отвечает обоснованно и уверенно. Усвоил предложенные основные литературные источники по программе и знаком с дополнительной литературой. Вовремя и качественно выполняет задания по занятию. Ситуационные задачи решает четко и обоснованно. В обсуждении темы и в дискуссиях активно участвует, защищает свои идеи. Активно участвует в интерактивных играх, полностью отвечает на вопросы.</p>
81-85	«4» хорошо	<p>Ответ студента по теме занятия полный, объем знаний в пределах программы, отвечает уверенно. Усвоил предложенные основные литературные источники по программе. В обсуждении темы и в дискуссиях активно участвует, защищает свои идеи. Активно участвует в интерактивных играх, в основном правильно отвечает на вопросы.</p>
76-80	«4» хорошо	<p>Ответ студента по теме в пределах программы. Усвоил предложенные основные литературные источники по программе. Вовремя выполняет заданные задания по занятию. При решении ситуационных задач отвечает четко, обоснованно. Активно участвует в обсуждении темы, в дискуссиях. Участвует в интерактивных играх, в основном правильно отвечает на вопросы, но допускает не очень существенные ошибки.</p>
71-75	«4» хорошо	<p>Ответ студента по теме в пределах программы. Усвоил предложенные основные литературные источники по программе. Вовремя выполняет заданные задания по занятию. При решении ситуационных задач отвечает правильно, но обосновать затрудняется. Активно участвует в обсуждении темы, в дискуссиях. Участвует в интерактивных играх, в основном правильно отвечает на вопросы, но некоторые ответы не обосновывает.</p>

66-70	«3» удовлетворительно	Ответ студента по теме в пределах 60-70% программы. Усвоил предложенные основные литературные источники по программе. Имеет представление о структурно-функциональных особенностях органа. На дополнительные вопросы отвечает не полностью. При решении ситуационных задач допускает ошибки. Пассивно участвует в интерактивных играх, допускает ошибки.
61-65	«3» удовлетворительно	Ответ студента по теме в пределах 55-60% программы. Усвоил некоторые из предложенных источников основной литературы по программе. Имеет представление о структурно-функциональных особенностях органа. На дополнительные вопросы отвечает не полностью. При решении ситуационных задач допускает ошибки. Пассивно участвует в интерактивных играх, лишь на некоторые вопросы отвечает правильно.
55-60	«3» удовлетворительно	Ответ студента по теме в пределах 50-55% программы, на дополнительные вопросы не отвечает. Усвоил некоторые из предложенных источников основной литературы по программе. Имеет представление о структурно-функциональных особенностях органа. На дополнительные вопросы отвечает частично. Ситуационные задачи самостоятельно решить не может. Пассивно участвует в интерактивных играх, отвечает только на некоторые вопросы, поверхностно.
31-54	«2» неудовлетворительно	Ответ студента по теме в пределах 30-40% программы, теоретически не имеет представления по теме, на дополнительные вопросы не отвечает. Предложенные источники основной литературы не усвоены. Не имеет представления о структурно-функциональных особенностях органа. Ситуационные задачи решить не может. Задания по теме вовремя не выполняет.
0-30	«2» неудовлетворительно	Ответ студента по теме в пределах 20-30% программы, на теоретические вопросы не отвечает. Предложенные источники основной литературы не усвоены. Представление о структурно-функциональных особенностях органа не имеет. Ситуационные задачи решить не может. Задания по теме вовремя не выполняет.

Методы изучения микротехники.

Предмет гистология изучает структуры, функции и законы развития клеток, тканей и органов, составляющих тело животного и человека. Слово гистология происходит от греческого слова «histos»-ткань, и «logos»- знание. В 19 веке французский ученый К. Майер ввел термин ткань и она является основным объектом изучения в гистологии. Ткань - это система клеток, образованных филогенезом, и органов, образованных из их продуктов. Наука гистология объединяет науки цитологию и эмбриологию, потому что метод массового изучения этих наук одинаков-микроскопия.

Основным методом изучения науки гистологии является микроскопия. Микроскопия проводится с помощью микроскопа. Первый микроскоп появился в Европе 300 лет назад и попал в Узбекистан в 1900-х годах. Микроскоп - это оптический прибор. Следовательно, возникновение науки гистологии было связано с физикой, с оптикой, с появлением первого микроскопа. В более широком смысле развитие гистологии связано с появлением оптики, физики, математики, компьютерных технологий, рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса (ЯМР), экстракции радиоактивных изотопов, ультрацентрифугирования, новых световых и электронных микроскопов.

В 1930-х и 1940-х годах появился электронный микроскоп, который положил начало стремительному развитию гистологии как науки. Виды световой микроскопии (ультрафиолет, фазовый контраст, поляризация), появившиеся до и после нее, также внесли и продолжают вносить большой вклад в развитие науки гистологии. В частности, ультрацентрифугирование сыграло очень важную роль в изучении частей клеток (органелл, ядер и т.д.).

В связи с этим микроскопия была разделена на методы световой и электронной микроскопии. В световых микроскопах используются различные лампы, освещающие естественным светом, электричеством.

Изображение под обычным световым микроскопом. Если разрешение современных световых микроскопов составляет 0,2 мкм, то в электронных микроскопах это расстояние составляет 1-2 нм. Под показательной способностью микроскопа мы понимаем способность микроскопа отображать части объекта (клетки) на расстоянии между двумя точками, а свет под микроскопом виден разных размеров (с использованием линз и окуляров). Эти микроскопы являются биологическими, существует множество типов таких микроскопов, и эти микроскопы используются в основном ввремя работы со студентами, наиболее распространены препараты приготовленные по общим морфологическим методам. На этих препаратах изучается общая структура клеток, тканей, органов. В общих морфологических методах препараты окрашивают в основном гематоксилином и эозином. При обычной световой микроскопии увеличение клеток размером от 4 мкм до 150 мкм может достигать 2500 раз.

Кроме того, для выявления под оптическим или сложным микроскопом различных волокон, клеток или химических веществ (белков, липидов, углеводов, витаминов, металлов и т.д.), которые обладают особыми свойствами в тканях также можно использовать препараты, приготовленные специальными цитохимическими, гистохимическими методами.

Иногда микроскопы различной сложности используются в диагностике или научных исследованиях, и сейчас таких микроскопов много. В них используются оптические системы, дополнительные технические, оптические средства. В состав сложных микроскопов могут входить следующие микроскопы:

Работа на ультрафиолетовом (ультрафиолетовый микроскоп) световом микроскопе. Светопропускающая линза этого микроскопа изготовлена из кварца (кремь, известняк), адаптированного для пропускания ультрафиолетового света, поперечное сечение, видимое в микроскопе, переносится на кварцевое стекло, предметное стекло и покрывается кварцевым покровным стеклом. Во время просмотра отражение биологического объекта видно в ультрафиолетовом свете. Поскольку длина волны ультрафиолетового света составляет 0,2 мкм, разрешение этого микроскопа составляет 0,1 мкм, что в 2 раза меньше.

Люминесцентная или флуоресцентная микроскопия. Каждая клетка обладает способностью излучать (люминесценцию или флуоресценцию). Это состояние вызвано коротковолновым излучением. Источником таких лучей служат ртутные или ксеноновые лампы. Под действием проходящего света длина волны света, излучаемого биологическим объектом, становится больше. Поэтому с помощью специальных светофильтров улавливаются флуоресцентные лучи, отражающие биологический объект, и объект виден. Флуоресценция бывает первичной и вторичной.

При первичной флуоресценции объект исследуется на основе излучаемого им света. Например, нервные клетки, серотонин в составе жировых клетках обладают способностью излучать первичную флуоресценцию, и это излучение обнаруживается (адреналин, норадреналин в том числе).

При вторичной флуоресценции препараты окрашиваются специальными красителями флуорохромами. В настоящее время существует множество видов флуорохромов. Например, при использовании флуорохромакридина (оранжевый) РНК имеет светло-красный цвет, а ДНК светло-голубой. С помощью такого излучения изучается структура и химический состав биологического объекта. Следовательно, флуоресцентная микроскопия основана на явлении возбуждения и рассеяния света в спектральном поле ультрафиолетового света.

Метод космической контрастной микроскопии используется для того, чтобы увидеть яркое отражение биологического объекта (структур), которое не видно под обычными микроскопами, но является четким и бесцветным. Фактически, в простой микроскопии яркий вид структур достигается окрашиванием. В фазово-контрастной микроскопии метод

окрашивания не используется. Напротив, структуры, исследованные с помощью кольцевой диафрагмы (где есть пространственная пластина), расположенной в конденсаторе, исследуются путем увеличения их контраста. При этом важную роль играют преломляющая сила и плотность структур в неокрашенном препарате. По мере увеличения яркости (контраста) структуры с разной способностью преломления света легко исследуются по контрасту. Например, многие инновации были получены при изучении поперечных мышечных волокон под этим микроскопом.

Просмотр под микроскопом темного поля. В центре поля зрения этого микроскопа будет темный конденсор, который не излучает свет. Объект освещается светом, падающим от источника. Объект, исследуемый под микроскопом, может казаться ярким. Этот микроскоп очень полезен для наблюдения за зернами серебра на автордиографии (они хорошо выглядят в темноте) или для наблюдения кристаллов (мочевая кислота, оксалаты), микробов (спирохеты) в моче в клинических лабораториях.

Поляризационная микроскопия. В поляризационном (полярном) микроскопе разделительный фильтр наливается на два полюса: один (поляризатор) между светом и объектом, другой - между линзой объектива и глазом. Второй фильтр имеет ось вращения головки, расположен перпендикулярно первому и не пропускает свет. Но оба фильтра имеют свойство вращения и могут изменять направление света. Исходя из этого, состав конструкций, лежащих на дне при повороте фильтра (коллаген, капилляры, микрофиламенты).

Интерференционная микроскопия - это разновидность космической контрастной микроскопии, которая используется для определения количества веществ в ткани. В интерференционном микроскопе свет, исходящий от лампы, делится на два потока: один поток проходит через объект, а другой поток проходит через объект. В объективе линзы два луча совмещены, есть интерференция. В отличие от объекта отличается толщиной, плотностью различных его частей, их контрастностью. На основе количественного анализа изменений определяется концентрация и масса веществ в объекте. Преимущество фазово-контрастных, интерференционных, темнопольных микроскопов состоит в том, что с их помощью можно изучать живые клетки в митотическом делении, метаболические процессы, во время движения.

Электронная микроскопия. Большим шагом вперед в развитии техники микроскопии были создание и применение электронного микроскопа (см. 1, б). В электронном микроскопе используется поток электронов с более короткими, чем в световом микроскопе, длинами волн. При напряжении 50 000 В длина волны электромагнитных колебаний, возникающих при движении потока электронов в вакууме, равна 0,0056 нм. Теоретически рассчитано, что разрешаемое расстояние в этих условиях может быть около 0,002 нм, или 0,000002 мкм, т.е. в 100 000 раз меньше, чем в световом микроскопе. Практически в современных электронных микроскопах разрешаемое расстояние составляет около 0,1—0,7 нм.

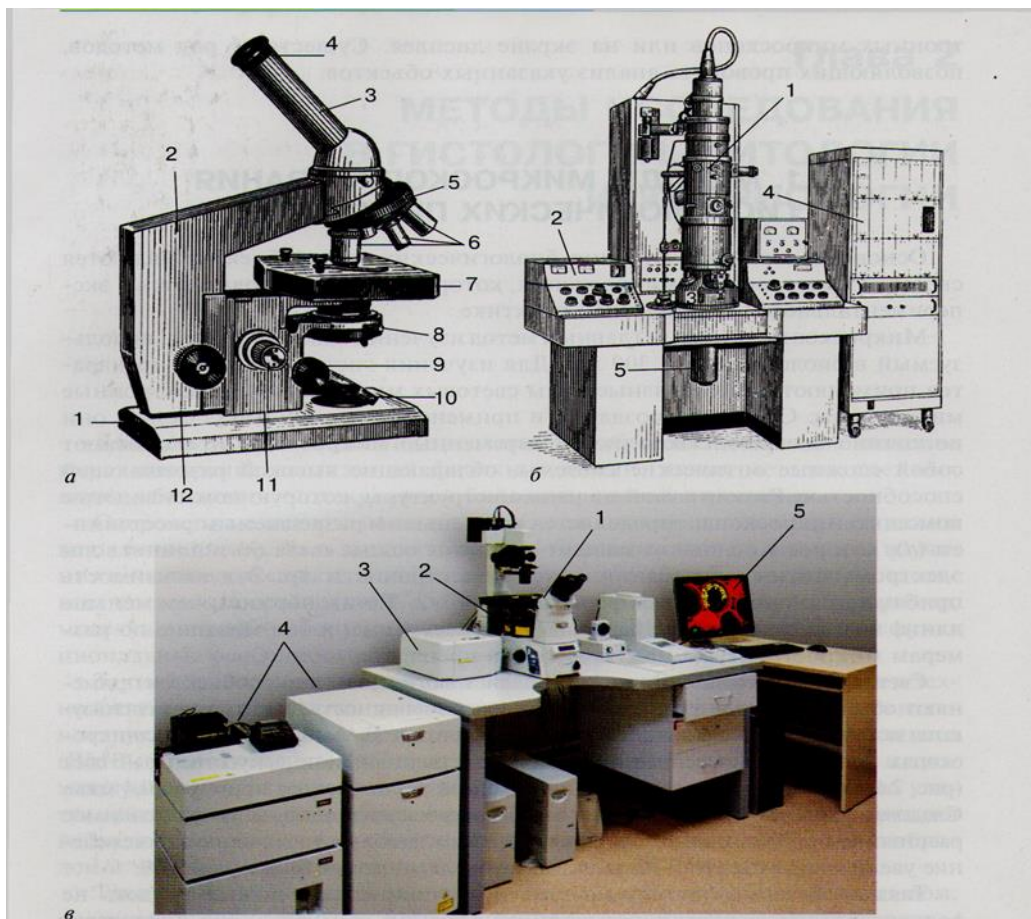


Рис.1. Микроскопы для биологических исследований.

а- световой биологический микроскоп “Биолам – С”: 1 - основание; 2 – тубусодержатель; 3 – наклонный тубус; 4 – окуляр; 5 – револьвер; 6 – объективы; 7 – столик; 8 – конденсор с ирисовой диафрагмой; 9 – винт конденсора; 10 – зеркало; 11 – микрометрический винт; 12 – макрометрический винт. б – электронный микроскоп ЭМВ-10АК с автоматизированной системой обработки изображений: 1 – колонка микроскопа (с электроннооптической системой и камерой для образцов); 2 – пульт управления; 3 – камера с люминесцентным экраном; 4 – блок анализа изображений; 5 – датчик видеосигнала.

В настоящее время широко используются **т р а н с м и с с и о н н ы е** (п р о с в е ч и в а ю щ и е) э л е к т р о н н ы е м и к р о с к о п ы (ТЭМ) и с к а н и р у ю щ и е (р а с т р о в ы е) э л е к т р о н н ы е м и к р о с к о п ы (СЭМ).

С помощью ТЭМ можно получить лишь плоскостное изображение изучаемого микрообъекта. Для получения пространственного представления о структурах применяют СЭМ, способные создавать трехмерное изображение. Растровый электронный микроскоп работает по принципу сканирования электронным микрозондом исследуемого объекта, т. е. последовательно «ощупывает» остро сфокусированным электронным пучком отдельные точки поверхности. Для исследования выбранного участка микрозонд движется по его поверхности под действием отклоняющих катушек (принцип телевизионной развертки). Такое исследование объекта называется **с к а н и р о в а н и е м** (считыванием), а рисунок, по которому движется микрозонд, — растром. Полученное изображение выводится на телевизионный экран, электронный луч которого движется синхронно с микрозондом.

Главными достоинствами растровой электронной микроскопии являются большая глубина резкости, широкий диапазон непрерывного изменения увеличения (от десятков до десятков тысяч раз) и высокая разрешающая способность.

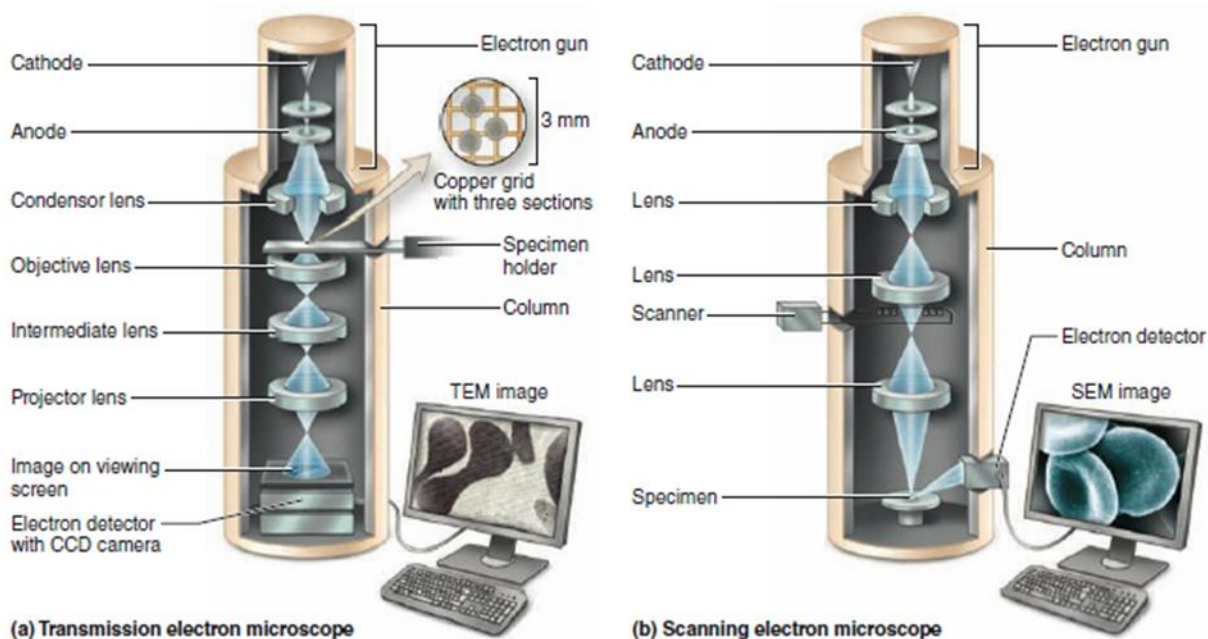


Рис.2 Принцип работы ТЭМ и РЭМ

Методы исследования химического состава и метаболизма клеток и тканей

Для изучения химического состава биологических структур — локализации веществ, их концентрации и динамики в процессах метаболизма применяют специальные методы исследования.

Цито- и гистохимические методы. Эти методы позволяют выявлять локализацию различных химических веществ в структурах клеток, тканей и органов — ДНК, РНК, белков, углеводов, липидов, аминокислот, минеральных веществ, витаминов, активность ферментов. Эти методы основаны на специфичности реакции между химическим реактивом и субстратом, входящим в состав клеточных и тканевых структур, и окрашивании продуктов химических реакций. Для повышения специфичности реакции часто применяют ферментативный контроль. Например, для выявления в клетках рибонуклеиновой кислоты (РНК) часто используют галлоцианин — краситель с основными свойствами, а наличие РНК подтверждают контрольной обработкой рибонуклеазой, расщепляющей РНК. Галлоцианин окрашивает РНК в сине-фиолетовый цвет. Если срез предварительно обработать рибонуклеазой, а затем окрасить галлоцианином, то отсутствие окрашивания подтверждает наличие в структуре

рибонуклеиновой кислоты. Описание многочисленных цито- и гистохимических методов дается в специальных руководствах.

В последние годы сочетание гистохимических методов с методом электронной микроскопии привело к развитию нового перспективного направления — электронной гистохимии. Этот метод позволяет изучать локализацию различных химических веществ не только на клеточном, но и на субклеточном и молекулярном уровнях.

Для изучения макромолекул клеток используют очень чувствительные методы с применением радиоактивных изотопов и антител, позволяющие обнаружить даже небольшое содержание молекул (менее 1000).

Радиоактивные изотопы при распаде ядра испускают заряженные частицы (электроны) или излучение (например, гамма-лучи), которые можно зарегистрировать в специальных приборах. Радиоактивные изотопы используют в методе радиоавтографии. Например, с помощью радиоизотопов ^3H - тимидина исследуют ДНК ядра, с помощью ^3H -уридина — РНК.

Метод радиоавтографии. Этот метод дает возможность наиболее полно изучить обмен веществ в разных структурах. В основе метода лежит использование радиоактивных элементов (например, фосфора — ^{32}P , углерода — ^{14}C , серы — ^{35}S , водорода — ^3H) или меченных ими соединений. Радиоактивные вещества в гистологических срезах обнаруживают с помощью фотоэмульсии, которую наносят на препарат и затем проявляют. В участках препарата, где фотоэмульсия соприкасается с радиоактивным веществом, происходит фотореакция, в результате которой образуются засвеченные участки (треки). Этим методом можно определять, например, скорость включения меченых аминокислот в белки, образование нуклеиновых кислот, обмен йода в клетках щитовидной железы и др.

Методы иммунофлюоресцентного анализа. Применение антител. Антитела — защитные белки, вырабатываемые плазмочитами (производными В-лимфоцитов) в ответ на действие чужеродных веществ (антигенов). Количество различных форм антител достигает миллиона. Каждое антитело имеет участки для «узнавания» молекул, вызвавших синтез этого антитела. В связи с высокой специфичностью антител в отношении антигенов они могут быть использованы для выявления любых белков клетки. Для выявления локализации белков антитела окрашивают флюоресцирующими красителями, а затем клетки изучают с помощью флюоресцентной микроскопии. Антитела можно использовать также для изучения антигенов на ультраструктурном уровне с помощью электронного микроскопа. Для этого антитела метят электронно-плотными частицами (микросферы коллоидного золота). Для усиления специфичности реакции применяют моноклональные антитела, образуемые линией клеток, — клонами, полученной методом гибридизации из одной клетки. Метод гибридизации позволяет получать моноклональные антитела с одинаковой специфичностью и в неограниченных количествах.

Фракционирование клеточного содержимого.

Фракционировать структуры и макромолекулы клеток можно различными методами — ультрацентрифугированием, хроматографией, электрофорезом. Подробнее эти методы описаны в учебниках биохимии.

Ультрацентрифугирование. С помощью этого метода клетки можно разделить на органеллы и макромолекулы. Вначале разрушают клетки осмотическим шоком, ультразвуком или механическим воздействием. При этом мембраны (плазмолемма, эндоплазматический ретикулум) распадаются на фрагменты, из которых формируются мельчайшие пузырьки, а ядра и органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы и пероксисомы) сохраняются интактными и находятся в образующей суспензии.

Для разделения вышеуказанных компонентов клетки применяют высокоскоростную центрифугу (80 000—150 000 оборотов/мин). Вначале оседают (седиментируют) на дне пробирки более крупные части (ядра, цитоскелет). При дальнейшем увеличении скоростей центрифугирования надосадочных фракций последовательно оседают более мелкие частицы — сначала митохондрии, лизосомы и пероксисомы, затем микросомы и мельчайшие пузырьки и, наконец, рибосомы и крупные макромолекулы. При центрифугировании различные фракции оседают с различной скоростью, образуя в пробирке отдельные полосы, которые можно выделить и исследовать. Фракционированные клеточные экстракты (бесклеточные системы) широко используют для изучения внутриклеточных процессов, например для изучения биосинтеза белка, расшифровки генетического кода и др.

Х р о м а т о г р а ф и я широко используется для фракционирования белков.

Э л е к т р о ф о р е з позволяет разделить белковые молекулы с различным зарядом при помещении их водных растворов (или в твердом пористом матриксе) в электрическом поле.

Методы хроматографии и электрофореза применяют для анализа пептидов, получаемых при расщеплении белковой молекулы, и получения так называемых пептидных карт белков. Подробно эти методы описаны в учебниках биохимии.

Изучение химического состава живых клеток. Для изучения распределения веществ и их метаболизма в живых клетках используют методы ядерного магнитного резонанса и микроэлектродную технику.

Я д е р н ы й м а г н и т н ы й р е з о н а н с (ЯМР) позволяет изучать малые молекулы низкомолекулярных веществ. Образец ткани содержит атомы в различных молекулах и в различном окружении, поэтому он будет поглощать энергию на различных резонансных частотах. Диаграмма поглощения на резонансных частотах для данного образца составит его спектр ЯМР. В биологии сигнал ЯМР от протонов (ядер водорода) широко используется для изучения белков, нуклеиновых кислот и др. Для изучения

макромолекул внутри живой клетки часто применяют изотопы ^3H , ^{13}C , ^{35}K , ^{31}P для получения сигнала ЯМР и слежения за его изменением в процессе жизнедеятельности клетки. Так, ^{31}P используется для изучения мышечного сокращения— изменений содержания в тканях АТФ и неорганического фосфата. Изотоп ^{13}C позволяет с помощью ЯМР исследовать многие процессы, в которых участвует глюкоза. Использование ЯМР ограничено его низкой чувствительностью: в 1 г живой ткани должно содержаться не менее 0,2 мМ исследуемого вещества. Преимуществом метода является его безвредность для живых клеток.

Количественные методы

В настоящее время наряду с качественными методами разработаны и применяются количественные гистохимические методы определения содержания различных веществ в клетках и тканях. Особенность количественно-гистохимических (в отличие от биохимических) методов исследования заключается в возможности изучения концентрации и содержания химических компонентов в конкретных структурах клеток и тканей.

Цитоспектрофотометрия — метод количественного изучения внутриклеточных веществ по их абсорбционным спектрам.

Цитоспектрофлуориметрия — метод количественного изучения внутриклеточных веществ по спектрам их флуоресценции или по интенсивности флуоресценции на одной заранее выбранной волне (цитофлуориметрия).

Современные микроскопы — цитофлуориметры позволяют обнаружить в различных структурах малые количества вещества (до 10^{14} — 10^{16} г) и оценить локализацию исследуемых веществ в микроструктурах.

Интерферометрия. Этот метод позволяет оценить сухую массу и концентрацию плотных веществ в живой и фиксированной клетках. С помощью этого метода, например, можно установить суммарное содержание белков в живых и фиксированных клетках.

Морфометрические методы позволяют определять с помощью специальных сеток (Е. Вейбеля, А. А. Глаголева, С. Б. Стефанова) число любых структур, их площади, диаметры и др. В частности, в клетках могут быть измерены площади ядер, цитоплазмы, их диаметры, ядерно-цитоплазматические отношения и др. Существуют ручная морфометрия и авто-матизированная морфометрия, при которой все параметры измеряются и регистрируются в приборе автоматически.

В последние годы все большее распространение получают **автоматизированные системы обработки изображений (АСОИЗ)**, позволяющие наиболее эффективно реализовать перечисленные выше количественные методы для изучения клеток и тканей. При этом аналитические возможности количественной микроскопии дополняются методами анализа и распознавания образцов, основанными на обработке с помощью электронных вычислительных машин (ЭВМ) информации, извлекаемой из изображений клеток и тканей. По существу можно говорить

об устройствах, не только усиливающих оптические возможности зрительного анализатора человека, но и многократно расширяющих его аналитические возможности. Высказывается мнение, что АСОИЗ совершает такой же переворот в морфологии, какой около 300 лет назад произошел благодаря изобретению светового, а около 50 лет назад — электронного микроскопа, поскольку они не только неизмеримо повышают производительность труда исследователя и не только объективизируют наблюдения, но и позволяют получать новую информацию о невыявляемых ранее процессах, численно моделировать и прогнозировать их развитие в клетках и тканях.

Микроскоп - это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза.

Разрешающая способность микроскопа дает раздельное изображение двух близких друг другу линий. Невооруженный человеческий глаз имеет разрешающую способность около 1/10 мм или 100 мкм. Лучший световой микроскоп примерно в 500 раз улучшает возможность человеческого глаза, т. е. его разрешающая способность составляет около 0,2 мкм или 200 нм.

Разрешающая способность и увеличение не одно и то же. Можно получить большое увеличение, но не улучшить его разрешение.

Различают полезное и бесполезное увеличения. Под полезным понимают такое увеличение наблюдаемого объекта, при котором можно выявить новые детали его строения. Бесполезное - это увеличение, при котором, увеличивая объект в сотни и более раз, нельзя обнаружить новых деталей строения.

В учебных лабораториях обычно используют световые микроскопы, на которых микропрепараты рассматриваются с использованием естественного или искусственного света. Наиболее распространены световые биологические микроскопы: БИОЛАМ, МИКМЕД, МБР, МБИ и МБС. Они дают увеличение в пределах от 56 до 1350 раз. Стереомикроскоп (МБС) обеспечивает подлинно объемное восприятие микрообъекта и увеличивает от 3,5 до 88 раз.

В микроскопе выделяют две системы: оптическую и механическую (рис. 1). К оптической системе относят объективы, окуляры и осветительную систему (конденсор с диафрагмой и светофильтром, зеркало или электроосветитель).

Объектив - определяет полезное увеличение объекта. Объектив состоит из нескольких линз. Увеличение объектива обозначено на нем цифрами. В учебных целях используют обычно объективы х8 и х40.



Окуляр состоит из 2-3 линз. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. Окуляры не выявляют новых деталей строения и в этом отношении их увеличение бесполезно.

Для определения общего увеличения микроскопа следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра.

Осветительное устройство состоит из зеркала или электроосветителя, конденсора с ирисовой диафрагмой и светофильтром, расположенных под предметным столиком. Они предназначены для освещения объекта пучком света.



Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометрическим механизмом и микрометрическим винтом, тубусодержателя, винта грубой наводки, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора, револьвера, предметного столика

Правила работы с микроскопом.

При работе с микроскопом необходимо соблюдать операции в следующем порядке:

1. Работать с микроскопом следует сидя;
2. Микроскоп осмотреть, вытереть от пыли мягкой салфеткой объективы, окуляр, зеркало;
3. Микроскоп установить перед собой, немного слева на 2-3 см от края стола. Во время работы его не сдвигать;
4. Открыть полностью диафрагму, поднять конденсор в крайнее верхнее положение;
5. Работу с микроскопом всегда начинать с малого увеличения;
6. Опустить объектив 8 х в рабочее положение, т. е. на расстояние 1 см от предметного стекла;
7. Глядя одним глазом в окуляр и пользуясь зеркалом с вогнутой стороной, направить свет от окна в объектив, а затем максимально и равномерно осветить поле зрения;
8. Положить микропрепарат на предметный столик так, чтобы изучаемый объект находился под объективом. Глядя сбоку, опускать объектив при помощи макровинта до тех пор, пока расстояние между нижней линзой объектива и микропрепаратом не станет 4-5 мм;
9. Смотреть одним глазом в окуляр и вращать винт грубой наводки на себя, плавно поднимая объектив до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта. Нельзя смотреть в окуляр и опускать объектив. Фронтальная линза может раздавить покровное стекло, и на ней появятся царапины;
10. Передвигая препарат рукой, найти нужное место, расположить его в центре поля зрения микроскопа;
11. Если изображение не появилось, то надо повторить все операции пунктов 6, 7, 8, 9;
12. Для изучения объекта при большом увеличении сначала нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа при малом увеличении. Затем поменять объектив на 40 х, поворачивая револьвер, так чтобы он занял рабочее положение. При помощи микрометрического винта добиться хорошего изображения объекта. На коробке микрометрического механизма имеются две риски, а на микрометрическом винте - точка, которая должна все время находиться между рисками. Если она выходит за их пределы, ее необходимо вернуть в нормальное положение. При несоблюдении этого правила, микрометрический винт может перестать действовать;
13. *По окончании работы с большим увеличением, установить малое увеличение, поднять объектив, снять с рабочего столика препарат, протереть чистой салфеткой все части микроскопа, накрыть его полиэтиленовым пакетом и поставить в шкаф*

МИКРОТЕХНИКА

Микроскопический препарат может быть временным или постоянным.

Процесс приготовления постоянного препарата включает в себя 10 этапов:

Взятие материала; фиксирование; промывка; обезвоживание; уплотнение; заливка; изготовление срезов; депарафинизация; окрашивание; заложение срезов.

1. Взятие материала. Кусочки тканей могут быть взяты как у живого организма (послеоперационный, экспериментальный, биопсийный, мазки, соскобы, отпечатки), так и у трупа. Кусочки материала должны быть небольшими, но достаточными, чтобы провести нужное исследование. Для световой микроскопии размеры их должны быть в пределах 0,5-1 см³, а для электронной микроскопии около 1 мм³.

2. Фиксация. Совокупность приёмов, направленных на сохранение в тканях и клетках прижизненного строения. Различают физические и химические методы фиксации. Химическая фиксация производится с помощью фиксаторов. Фиксаторы бывают простые и сложные. К первым относят обезвоживающие средства (метанол, этанол, ацетон), альдегиды (формальдегид, глютаральдегид), кислоты (уксусная, пикриновая). К сложным фиксаторам относят различные смеси фиксирующих веществ. Например, смесь Буэна (пикриновая кислота, формалин, уксусная кислота). Большое значение в качестве фиксатора имеет осмиевая кислота для фиксирования тонких структур клетки.

3. Промывка. После формалина и всех цветных фиксаторов, содержащих пикриновую кислоту или хромовые соли кусочки подвергаются промыванию. Для этого фиксатор сливается, а баночка с кусочками завязывается марлей и ставится под медленно текущую струю воды на 12-24 часа.

4. Обезвоживание и уплотнение. Большинство фиксаторов являются водными растворами, а вода будет мешать последующей обработке материала. Для этого кусочки проводят в спиртах возрастающей концентрацией (60⁰, 70⁰, 80⁰, 90⁰, 96⁰, 100⁰). Вместе с обезвоживанием происходит уплотнение кусочков тканей.

5. Парафиновая заливка. Парафин при обычной температуре является твердым телом. Для заливки в парафин кусочков его переводят в жидкое состояние. Температура плавления парафина 52-59⁰. Парафин не смешивается со спиртом, поэтому применяются промежуточные среды: ксилол, толуол, хлороформ. Для равномерной пропитки кусочки последовательно переводят в смесь спирта с выбранной промежуточной средой, а затем в чистый хлороформ, далее в смесь хлороформа с парафином, а затем в чистый парафин при температуре 56⁰. После того как пропитывание парафином закончилось, чистый расплавленный парафин наливают в специальные формочки. Туда нагретым пинцетом помещают кусочки тканей

и охлаждают в холодной воде. Парафин застывает, а залитый в него кусочек вырезают и приклеивают к деревянному кубику. Получается парафиновый блок.

6. Изготовление срезов. Для этого применяется специальный прибор – микротом (санный, замораживающий, микротом Майнота). Полученные срезы наклеиваются на предметные стекла.

7. Окраска срезов. Окраской достигается цветовые выделения различных структурных частей клетки и тканей и усиление их контрастности. Употребляемые красители можно разделить на три группы: а) *кислые красители*, окрашивающие всю цитоплазму клетки; б) *основные красители*, окрашивающие преимущественно хроматин ядер; в) *специальные красители*, специфически окрашивающие определенные вещества. В качестве основного красителя чаще применяется гематоксилин, он окрашивает ядро клетки в фиолетовый цвет. Из кислых красителей применяется эозин, который окрашивает цитоплазму в красный цвет. Специальные красители рассчитаны на выделение определенных морфологических структур. Так, жировые включения окрашиваются суданом -3 в красновато-оранжевый цвет, слизь окрашивается муцином в фиолетовый цвет и др.

8. Депарафинизация. Парафин не пропускает краски и поэтому должен быть удален. Для этого стекла с наклеенными парафиновыми срезами проводят через два стаканчика с ксилолом, хорошо растворяющим парафин. Так, как ксилол не смешивается с водой то его нужно удалить при помощи абсолютного спирта; последний заменяется 96⁰ и 70⁰ спиртом.

9. Окраска. Производится на предметных стеклах, на которых срезы наклеены. Для этого несколько капель раствора краски наносят на срезы, либо стекла со срезами погружаются в стаканчики с растворами красок.

10. Заключение. В качестве среды для заключения применяются прозрачные смолы: *канадский бальзам, пихтовый бальзам*. Они растворяются в ксилоле. Так, как окрашенные срезы находятся в воде их перед заключением необходимо провести через промежуточные среды, которые с одной стороны смешивались бы с водой, с другой- с ксилолом. Такой средой опять же служит спирт (70⁰,96⁰,100⁰). Затем в чистый ксилол. Препарат готов к заключению. Пипеткой наносится бальзам на срез и накрывается покровным стеклом.

Задачи:

1. Преподаватель спрашивает у студента перечислить названия сложных фиксаторов, студент отвечает, что к ним относится формалин. Прав ли он?

Ответ: нет, не прав, формалин относится к простым фиксаторам.

2. Необходимо выявить наличие жира в клетках. Какой фиксатор вы рекомендуете использовать?

Ответ: рекомендуется использование жидкостей Буэна, растворы хромовой кислоты и её солей, “осмиевую кислоту”.

3. Вами получен материал, фиксированный спиртовым фиксатором. Какие этапы обработки можно исключить?

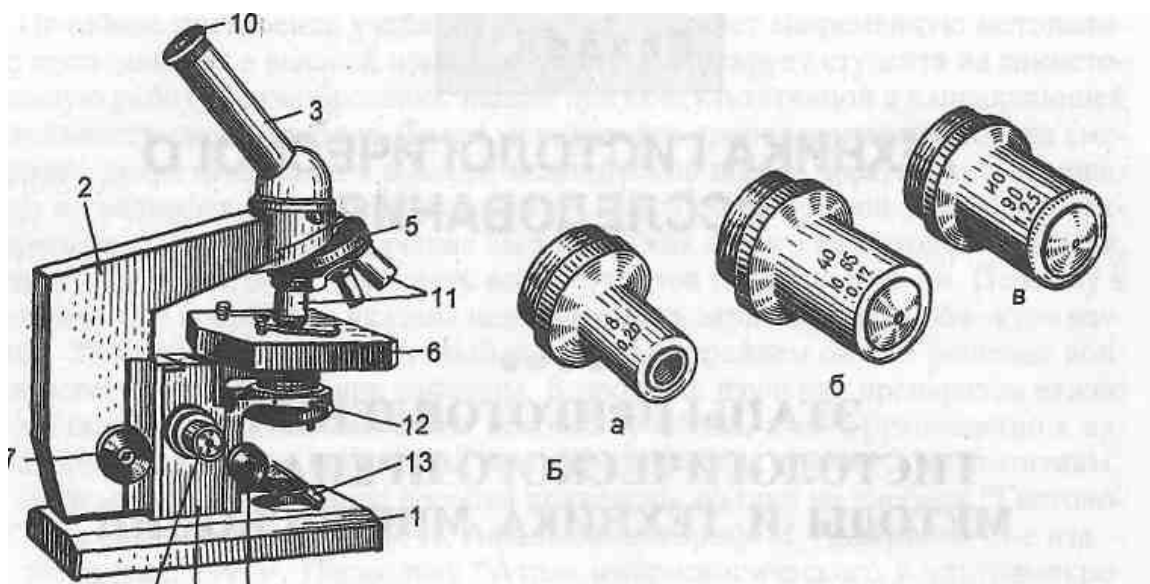
Ответ: обезвоживание.

4. На рисунке изображены пробирки, на которых последовательно указаны спирты возрастающей концентрацией. Скажите для чего они используются?

Ответ: спирты возрастающей концентрацией применяют для обезвоживания кусочков тканей.

Задания для самостоятельной работы:

1 Обозначьте все указанные части светового микроскопа:



Ответ: Микроскоп для биологических исследований.

А — общий вид: 1 — основание; 2 — тубосодержатель; 3 — тубус; 4 — коробка механизма микроподачи; 5 — револьверное устройство; 6 — предметный столик; 7 — макрометрический винт; 8 — микрометрический винт; 9 — винт конденсора; 10 — окуляр; 11 — объективы; 12 — конденсор с ирисовой диафрагмой; 13 — зеркало; Б — объективы малого (а), большого (б) и иммерсионного (в) увеличений.

2. Заполните таблицу, перечислив основные группы красителей, укажите название структур, воспринимающих краситель, и примеры красителей.

Группы красителей	Название окрашиваемых структур	Пример красителя

Ответ:

Группы красителей	Название окрашиваемых структур	Пример красителя
Кислые	Цитоплазма клеток	Эозин
Основные	Ядро клеток	Гематоксилин
Специальные	Эластические волокна	Орсеин

3. Заполните таблицу, отметив основные виды микроскопии, их разновидности кратко сформулируйте цели использования каждой разновидности.

Виды микроскопии	Разновидности	Цели использования

Ответ:

Виды микроскопии	Разновидности	Цели использования
Световая	Сравнительная микроскопия	Используется для изучения изменений нормальных и патологических тканей
	Фазово-контрастная микроскопия	Для изучения живых объектов или неокрашенных препаратов.

Электронная	Просвечивающие микроскопы	Позволяют получить плоскостное изображение изучаемого объекта
	Растровые микроскопы	Способны создавать трехмерные изображения структур.

Практическая часть

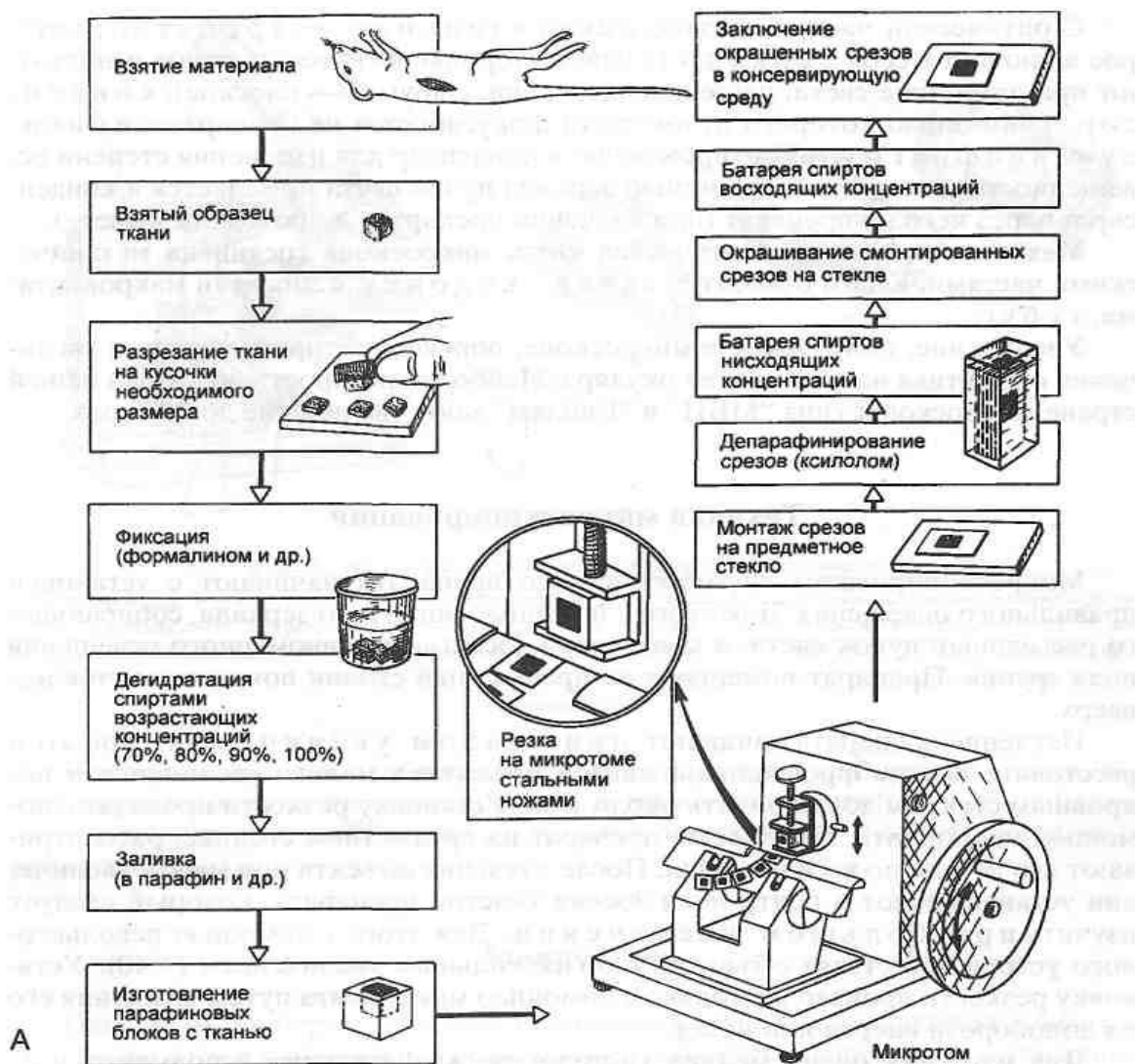
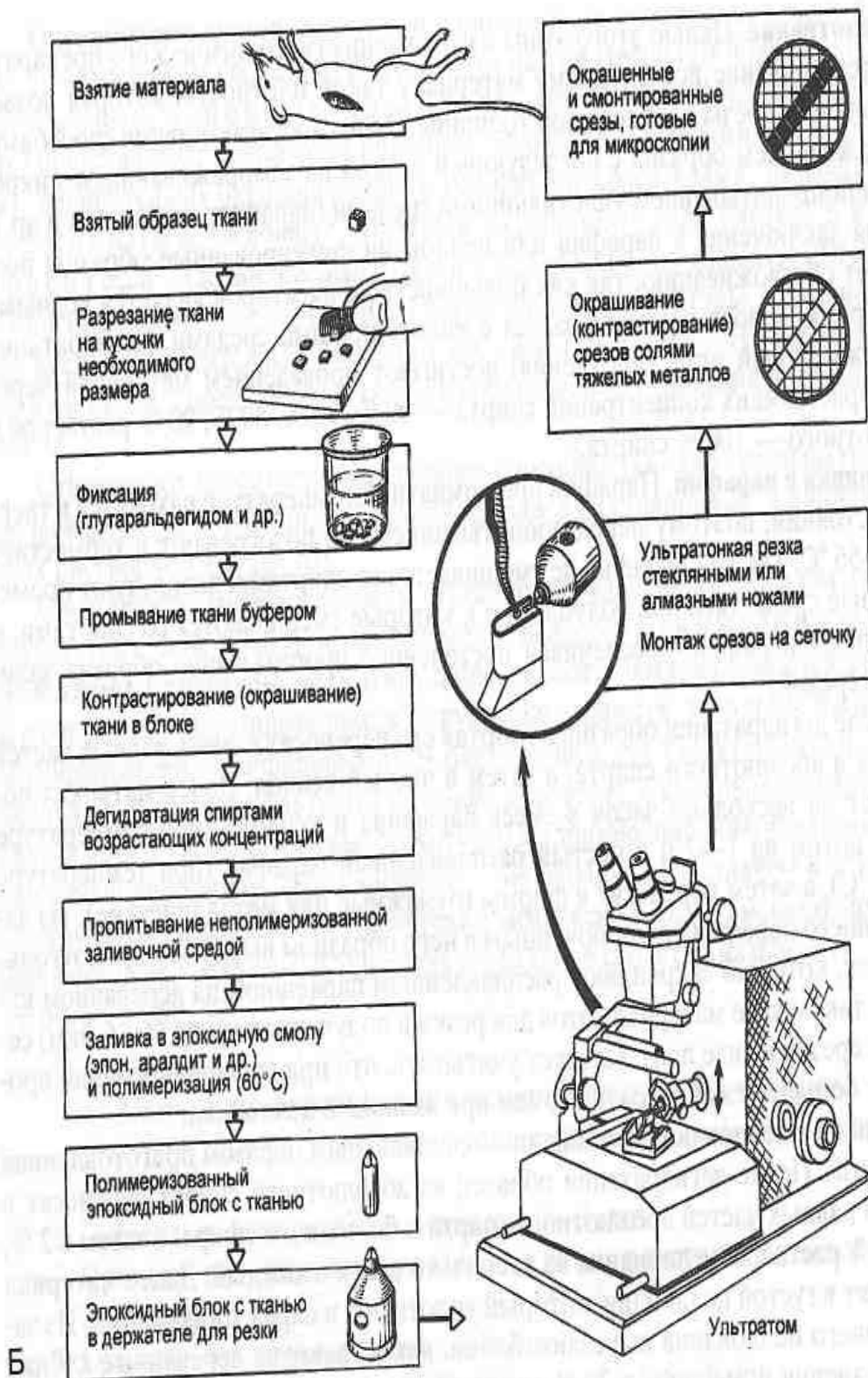


Рис. 2. Этапы приготовления гистологического препарата для световой (А) и электронной (Б) микроскопии.

Этапы приготовления гистологического препарата для электронной микроскопии.



ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МАЗКОВ КРОВИ

1. Название практического навыка: Техника приготовления мазка крови.

2. Цель: овладение составляющими исследовательской деятельности. Развить умение вести самостоятельный поиск, отбор информации, её преобразование, сохранение, передачу в виде текстов, рисунков, таблиц, выводов.

3. Клиническое значение: Верная интерпретация микроскопических изменений невозможна на плохо приготовленных (толстых, перекрашенных или недокрашенных) гистологических препаратах. Поэтому для правильной интерпретации мазка крови недостаточно квалификации врача-диагноста помимо этого необходимо точно выполнять все этапы техники приготовления гистологического препарата.

4. Лабораторное оборудование по предмету гистология.

1. Предметные, покровные и шлифовальные стекла;
2. Карандаш по стеклу;
3. Готовый краситель азур-эозин;
4. Скарификатор.

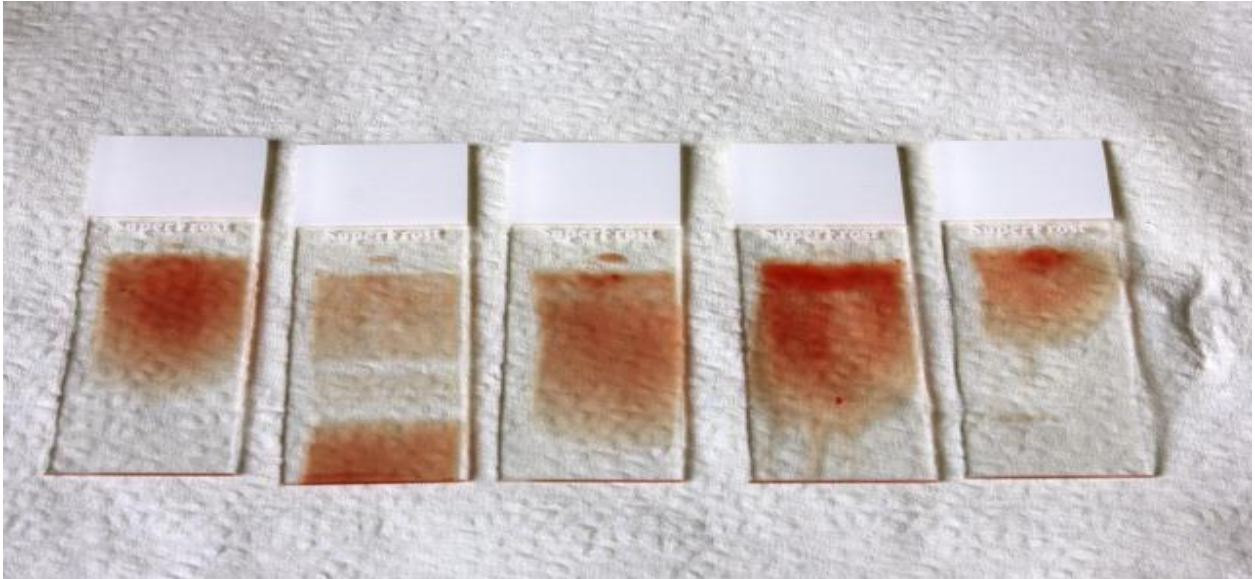
5. Выполняемые этапы:

№	Мероприятие	Выполнил	Не выполнил
1.	Приготовление мазка. Небольшую каплю крови помещают в середине предметного стекла на 1-2 см от одного из концов.		
2.	Шлифовальное стекло ставят на предметное стекло под углом 30-45 градусов на 1-2 мм перед каплей.		
3.	Двигают шлифовальное стекло немного назад, чтобы стекло соприкоснулось с каплей крови так, чтобы она растеклась по углу между двумя стеклами.		
4.	Далее быстро проводят движение вперед шлифовальным стеклом по предметному стеклу.		
5.	Высушивание мазков на воздухе и маркировка.		

6. Интерпретация полученных результатов.

Хорошо сделанный мазок тонок, имеет желтоватый цвет и оканчивается «метелочкой». Густо-розовые и красноватые мазки непригодны

для счета, так как они слишком толсты и клеточные элементы при этом дифференцировать невозможно. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток.



Слева направо. Степень качество приготовленного мазка крови:

Мазок 1 - Идеальный мазок

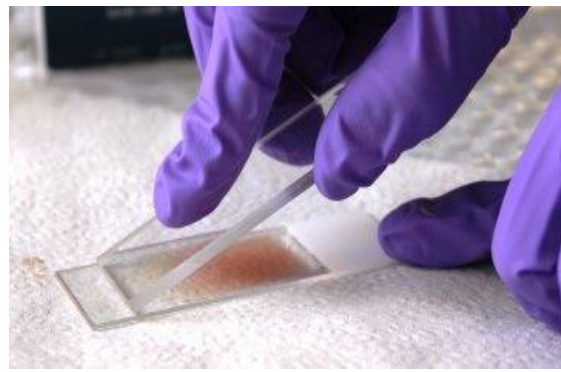
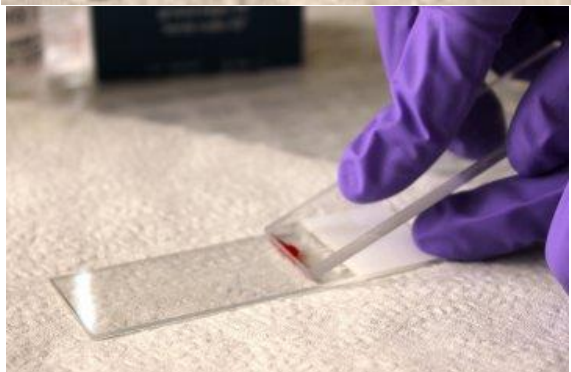
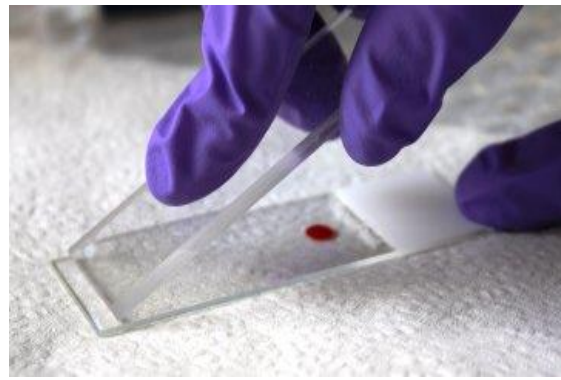
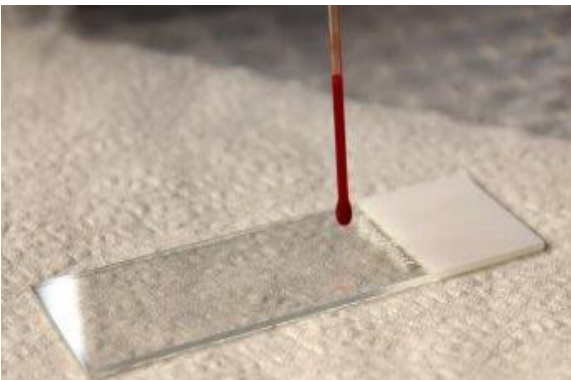
Мазок 2 - В момент размазывания мазка произошла остановка.

Мазок 3 - Перекос мазка.

Мазок 4 - Капля крови слишком большая.

Мазок 5 - Мазок слишком короткий.

7. Раздаточный материал к практическому навыку.



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ

1. Название практического навыка: идентификация форменных элементов крови.

2. Цель: правильно идентифицировать форменные элементы крови.

3. Клиническое значение: кровь является тканью, быстро реагирующей на отклонения в физиологическом состоянии организма и связующим звеном между всеми органами и системами организма. Количественные и качественные свойства форменных элементов крови являются чрезвычайно информативными показателями, характеризующими состояние здоровья человека, поэтому строение и функции форменных элементов крови, состав плазмы имеет важное диагностическое значение.

Знание морфологии крови необходимо студенту при изучении соответствующих вопросов по нормальной и патологической физиологии, лабораторной диагностике, а также врачу любого профиля. Анализ крови позволяет поставить предварительный диагноз и наметить тактику и стратегию дальнейшего ведения заболевшего. Показатели крови в ряде случаев появляются раньше жалоб больного, изменений других методов обследования больного, что делает их крайне полезными для профилактических осмотров.

В последние годы все чаще клинический анализ крови выполняется на автоматических счетчиках, что значительно повышает точность подсчета, но, однако же, не отменяет значения данных, полученных «вручную» с помощью светооптической микроскопии.

4. Лабораторное оборудование по предмету гистология.

- световой микроскоп;
- микропрепарат мазка крови человека;

5. Выполняемые этапы:

№	Мероприятие	Выполнил	Не выполнил
1.	Привести микроскоп в рабочее положение		
2.	Предметное стекло с окрашенным и высохшим мазком крови поместить на столик микроскопа и рассматривать мазок при слабом увеличении (объектив - 8х): видно множество эритроцитов, окрашенных в бледно-розовый цвет, среди них – темно окрашенные ядра лейкоцитов.		

3.	<p>Не меняя положения стекла, нанести каплю иммерсионного масла на край мазка, на место, расположенное под объективом. Перевести иммерсионный объектив (90x) или (100x) в вертикальное по отношению к мазку положение, при этом объектив погружается в каплю масла. Осторожно с помощью макровинта добиваться получения изображения в поле зрения микроскопа. Затем с помощью макровинта устанавливать четкую видимость препарата.</p>		
4.	<p>Критерием правильно выбранного для каждого глаза фокусного расстояния будет ясное изображение клеток с четкими границами и внутриклеточной структурой. Найти тонкие участки мазка и приступить к изучению морфологии форменных элементов крови, обращая внимание на их форму, размеры, интенсивность окраски, наличие патологических форм, внутриклеточных включений и т. п. Для получения более полного представления о морфологии клеток необходимо просмотр несколько полей зрения, передвигая мазок.</p>		
5.	<p>По окончании микроскопии с помощью макровинта поднимать тубус микроскопа, снимать мазок с предметного столика, стирать иммерсионное масло с объектива и предметного стекла марлей, смоченной эфиром.</p>		

6. Интерпретация полученных результатов.

Эритроциты самые многочисленные форменные элементы крови, не содержат ядро. В окрашенных препаратах они имеют форму диска с небольшим просветлением в центре. Оксифилия клетки зависит от присутствия гемоглобина, поэтому по интенсивности окраски можно судить о степени насыщения эритроцитов гемоглобином. Нормальная величина эритроцитов 7-8 мкм. Изменение морфологии эритроцитов в виде появления эритроцитов разного размера (анизоцитоз), разной формы (пойкилоцитоз),

разной окраски (анизохромия) являются важными морфологическими симптомами различных форм анемии.

Тромбоциты - безъядерные форменные элементы крови размером от 1 до 5 мкм являются фрагментами цитоплазмы мегакариоцитов, имеют гиаломер и грануломер. Плазмолемма тромбоцитов состоит из трехслойной мембраной, играющей большую роль в процессах адгезии и агрегации тромбоцитов. Популяция тромбоцитов неоднородна. В ней различают зрелые тромбоциты, юные, старые и формы раздражения.

Лейкоциты: в зависимости от наличия специфических гранул лейкоциты делят на гранулоциты (зернистые) и агранулоциты (незернистые).

Гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) содержат специфические и азурофильные гранулы. В цитоплазме **агранулоцитов** (моноцитов, лимфоцитов) присутствуют только азурофильные гранулы.

Для гранулоцитов характерно дольчатое сегментированное ядро разнообразной формы, в связи с чем их называют полиморфноядерными лейкоцитами.

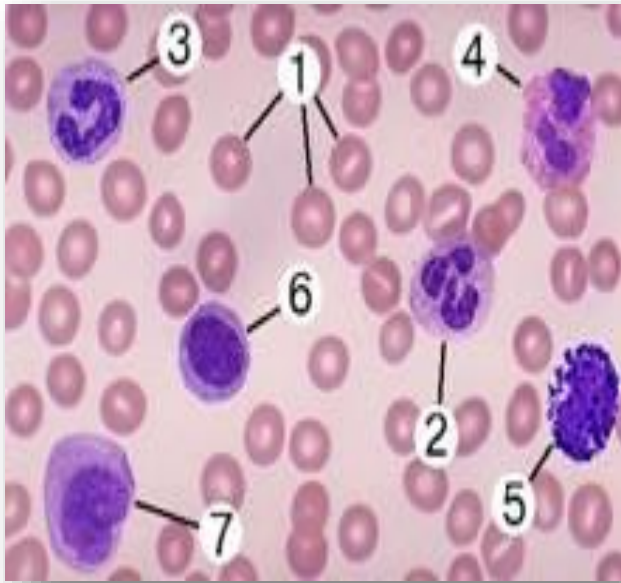
Неспецифические гранулы почти одинаковые у всех видов гранулоцитов, они небольших размеров (0,4-0,8 мкм) и являются разновидностью лизосом.

Специфические гранулы у каждого из трех видов свои и от вида специфических гранул зависит тинкториальные свойства (окрашиваемость) цитоплазмы гранулоцита.

Второй морфологической особенностью гранулоцитов является форма ядер. У зрелых гранулоцитов (кроме базофилов) ядро состоит из нескольких сегментов, связанных перемычками. Такие гранулоциты называются **сегментоядерными**. У нейтрофилов и эозинофилов в крови встречаются незрелые формы, то есть палочкоядерные (ядро подковообразной формы) и юные (ядро бобовидной формы) гранулоциты.

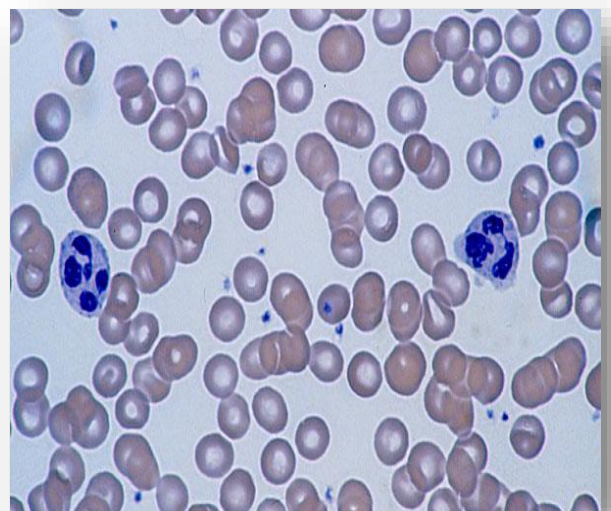
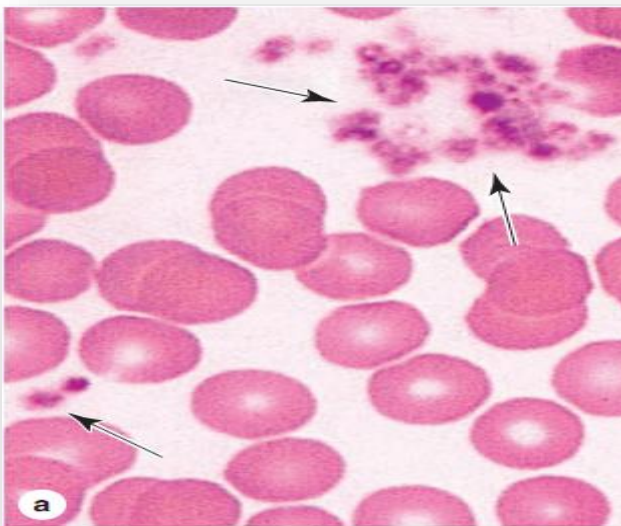
Агранулоциты (незернистые лейкоциты)

К этой группе лейкоцитов относятся лимфоциты и моноциты. В отличие от гранулоцитов они не содержат в цитоплазме специфической зернистости, а их ядра не сегментированы.



8. Раздаточный материал к практическому навыку.

- 1-эритроциты;*
- 2-нейтрофилы;*
- 3-палочкоядерный нейтрофил;*
- 4-эозинофил;*
- 5-базофил;*
- 6-лимфоцит;*
- 7-моноцит*



Стрелками показаны тромбоциты

ДИАГНОСТИКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПОД СВЕТОВЫМ МИКРОСКОПОМ.

1. Название практического навыка: Диагностика гистологических препаратов под световым микроскопом.

2. Цель: освоить навыки диагностики гистологических препаратов под световым микроскопом.

3. Клиническое значение: Микроскопическое исследование – чисто врачебный этап работы. Опыт врача-морфолога, его квалификация являются определяющими факторами для правильной интерпретации результатов гистологического исследования, и до сих пор этот этап является самым субъективным методом исследования. Знание характерных морфологических признаков тканей и органов в норме помогает разобраться в сущности многих патологических процессов, правильно поставить диагноз и прогнозировать исход болезни. Исследуя препарат под микроскопом, врач-диагност определяет наличие злокачественной опухоли или ее отсутствие, степень гистологической злокачественности, другие прогностические критерии, важные для пациента.

4. Лабораторное оборудование по предмету гистология.

1. Световой микроскоп

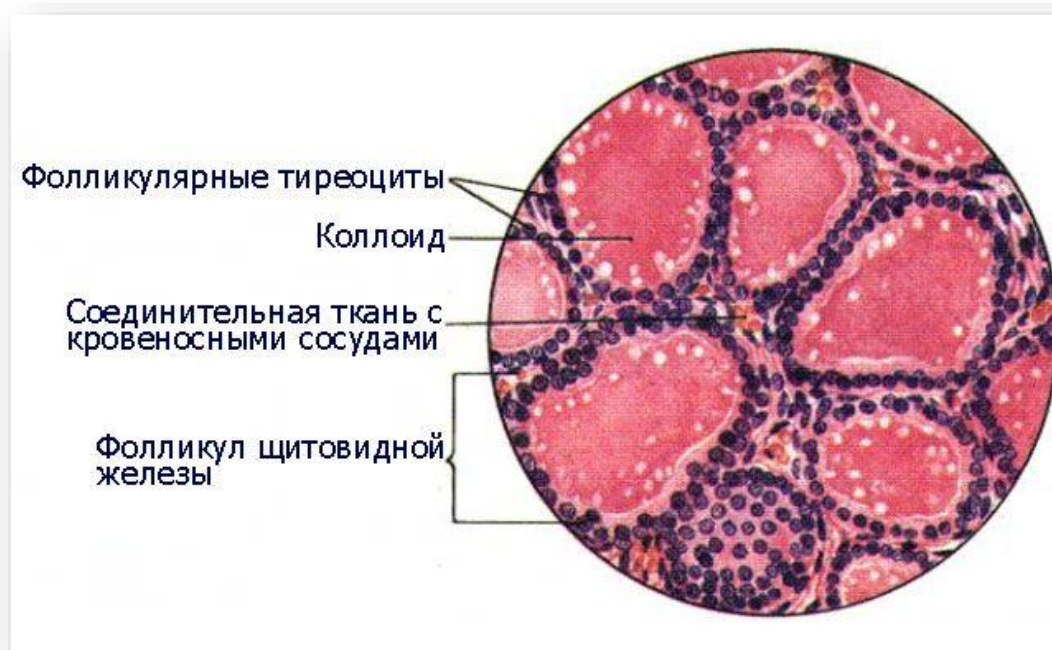
2. Гистологический микропрепарат

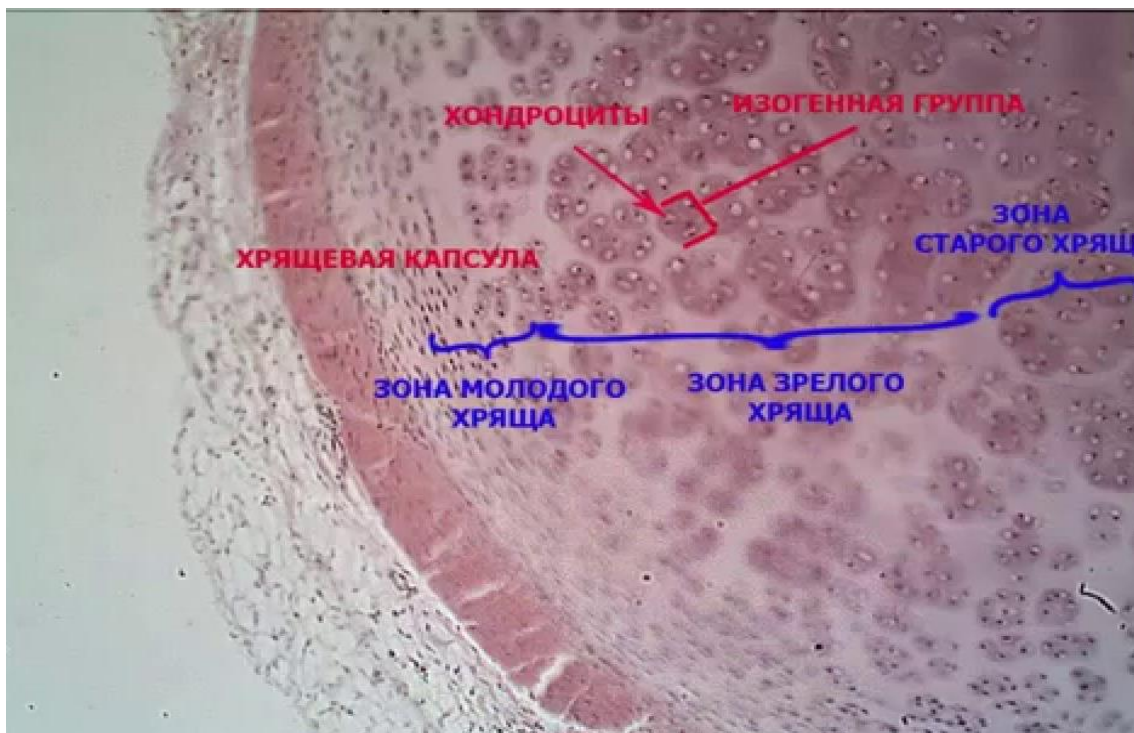
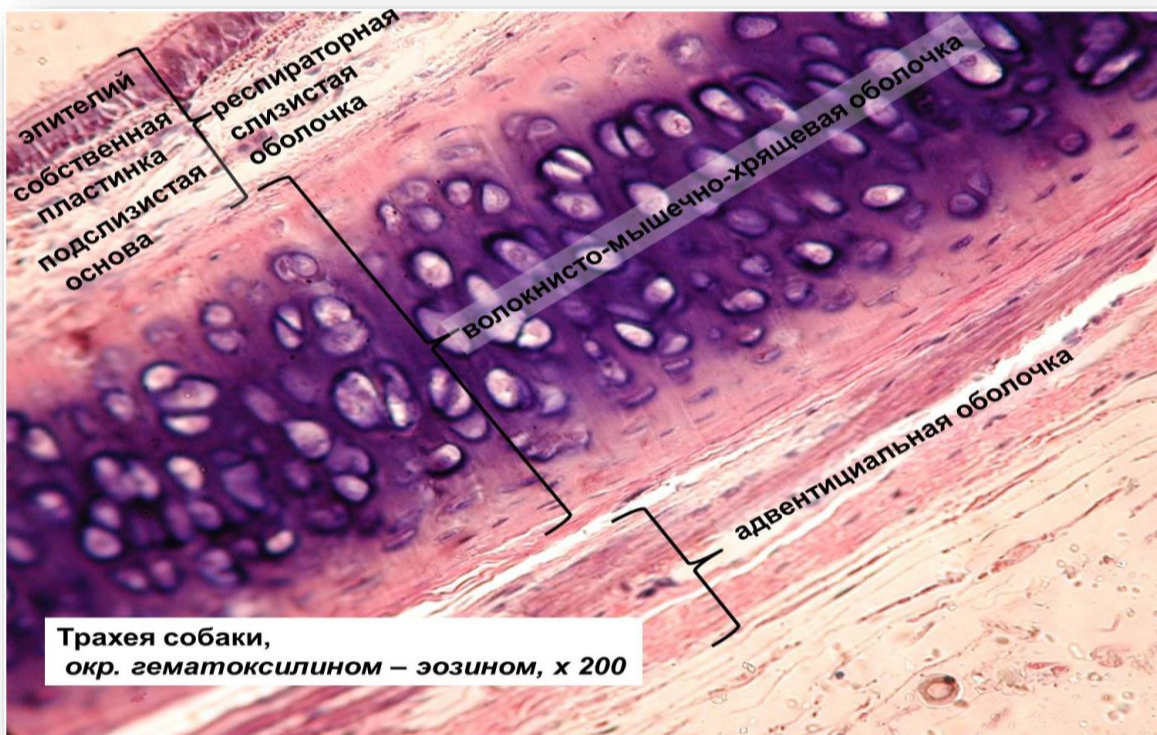
5. Выполняемые этапы:

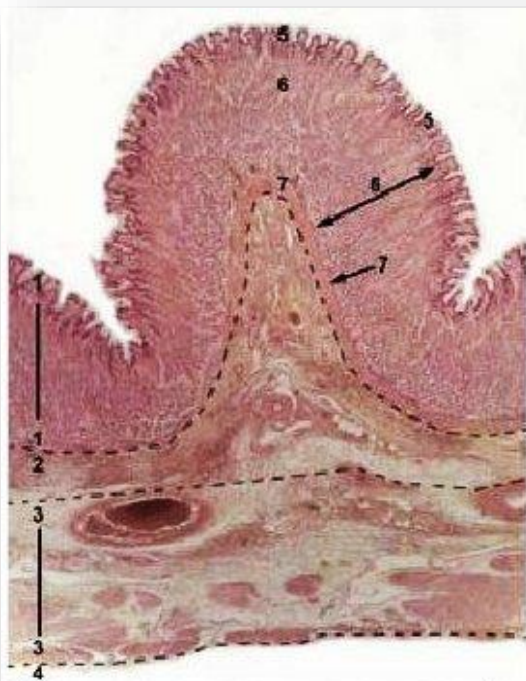
№	Мероприятие	Не выполнено	Полностью правильно выполнено
1.	Привести микроскоп в рабочее положение	0	15
2.	Положить препарат на предметный столик микроскопа так, чтобы объект приходился над отверстием столика. При этом надо обязательно проверить положение препарата покровным стеклом вверх	0	15
3.	Рассмотреть препарат при слабом увеличении (объектив - 8х). Сориентировавшись в препарате, найти место, подходящее для изучения при сильном увеличении, поставить его в центр поля зрения	0	15
4.	Рассмотреть препарат под большим объективом (40х)	0	15
5.	Дать характеристику препарата	0	40
	Итого	0	100

6. Интерпретация:

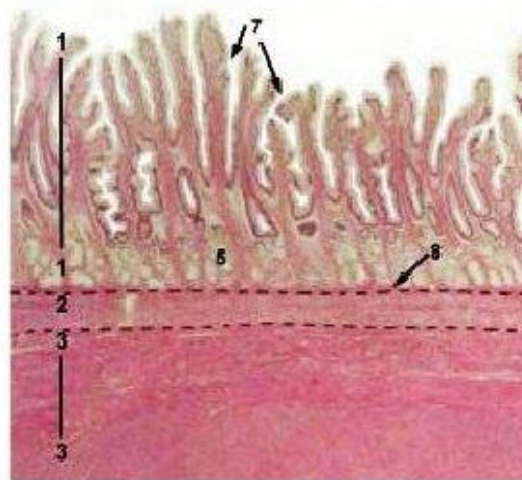
1. Название препарата.
2. Окраска препарата (гематоксилин-эозин, орсеин, железный гематоксилин и т.д.)
3. Принцип строения органа; **I. Слоисто – оболочный:** количество оболочек; название каждой оболочки; слои в оболочках с названием тканей их образующих.
4. Указать морфологические особенности тканей в слоях данного органа. Указать источники происхождения тканей.
5. Другие структуры в оболочке или слое: железы, кровеносные и лимфатические сосуды, нервные стволы, интрамуральные ганглии, лимфоидные фолликулы, с указанием их характерных морфологических признаков.
6. **II. Паренхиматозный орган:** 1) строма: капсула – назвать ткань, трабекулы – назвать ткань, кровеносные сосуды (артерии, вены) нервные стволы, интрамуральные ганглии. 2) паренхима: назвать вид ткани, составляющей основу паренхиматозного органа: эпителиальная, ретикулярная. Назвать и описать основные структурные единицы паренхимы, например: нефрон, лимфоидный фолликул, секреторный отдел железы, эпителиальные тяжи, ацинус и т.д., или основные части паренхимы (например: белая и красная пульпа в селезенке; корковое и мозговое вещество, зоны)
7. Раздаточный материал к практическому навыку.





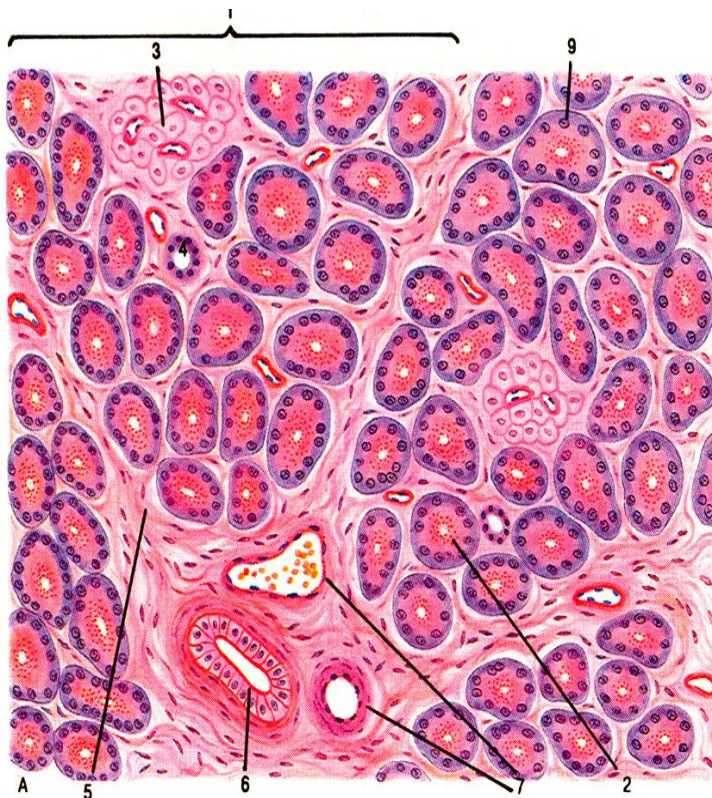


Дно желудка, окраска гематоксилин-эозином: 1 — слизистая оболочка, 2 — подслизистая оболочка, 3 — мышечная оболочка, 4 — серозная оболочка, 5 — эпителий, 6 — собственная пластинка слизистой оболочки, 7 — мышечная пластинка слизистой оболочки.



Пилорическая часть желудка, окраска гематоксилин-эозином: 1 — слизистая оболочка, 2 — подслизистая оболочка, 3 — мышечная оболочка, 5 — собственная пластинка слизистой (содержит железы), 7 — ямки в слизистой оболочке, 8 — мышечная пластинка слизистой оболочки.

Пример: Микропрепарат поджелудочной железы. Окраска гематоксилин-эозином.



(5), местами видны внутридольковые вставочные протоки, которые имеют

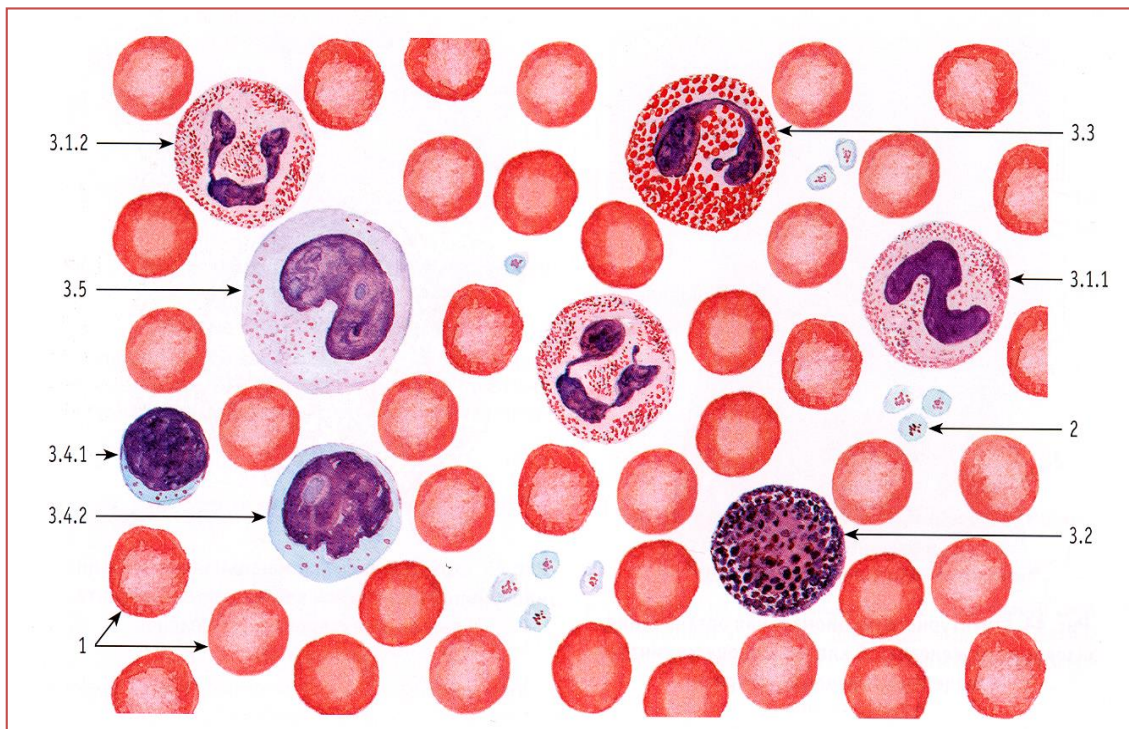
Под малым увеличением микроскопа видны розовые прослойки соединительной ткани, которые делят железу на дольки. В прослойках виден междольковый выводной проток, выстланный однослойным призматическим эпителием (6), и кровеносные сосуды (7), которые легко отличить от протока, так как клетки выстилающего их эндотелия плоские.

Внутри дольки видны многочисленные концевые отделы — ацинусы (2), плотно прилежащие друг к другу, между ними имеются тонкие прослойки рыхлой соединительной ткани

небольшой диаметр и выстланы низким призматическим эпителием, окрашенным базофильно. Секреторные клетки ацинусов окрашены по-разному: базальная часть базофильная (синего цвета), а апикальная часть оксифильная (красного цвета).

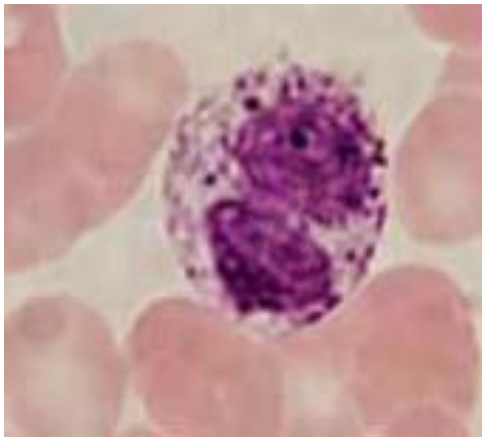
В центре ацинусов иногда видны клетки вставочных протоков, которые начинаются внутри ацинуса. Эти клетки называют центроацинозными. Среди интенсивно окрашенных концевых отделов экзокринной части железы встречаются светлые островки, составляющие эндокринную часть. Они расположены в рыхлой соединительной ткани. Между эндокриноцитами видны многочисленные кровеносные капилляры.

При большом увеличении в концевых отделах видна базофильная базальная часть – гомогенная зона, и светлая, содержащая ацидофильные гранулы апикальная часть – зимогенная зона. Между ацинусами расположения скопления эндокринных клеток –инсулоцитов (3).

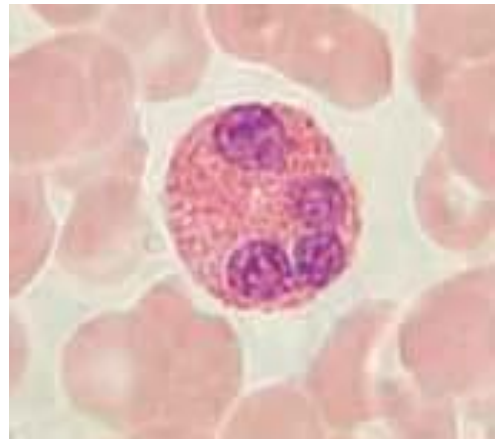


МАЗОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА Окраска по Романовскому-Гимзе

- 1 – эритроциты
- 2 – тромбоциты
- 3 - лейкоциты:
 - 3.1 - нейтрофильный гранулоцит
 - 3.1.1 - палочкоядерный
 - 3.1.2 - сегментоядерный
 - 3.2 - базофильный гранулоцит
 - 3.3 - эозинофильный гранулоцит
- 3.4 – лимфоцит:
 - 3.4.1 – малый лимфоцит
 - 3.4.2 - средний лимфоцит
- 3.5 - моноцит



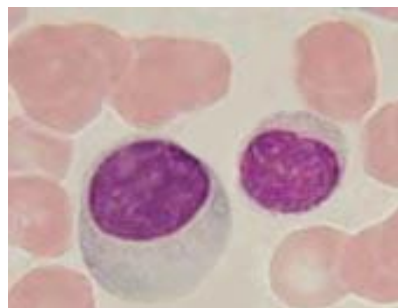
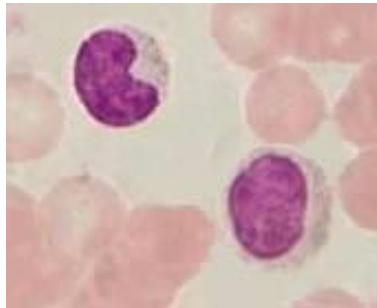
БАЗОФИЛЬНЫЙ ЛЕЙКОЦИТ



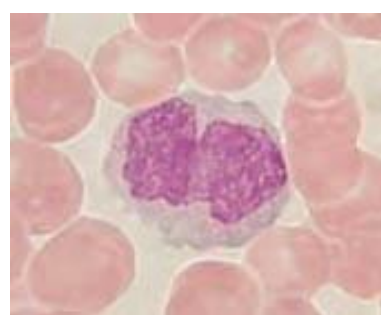
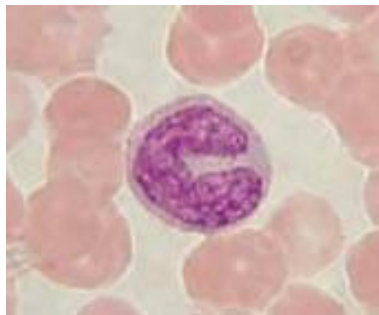
ЭОЗИНОФИЛЬНЫЙ ЛЕЙКОЦИТ



НЕЙТРОФИЛЬНЫЙ ЛЕЙКОЦИТ

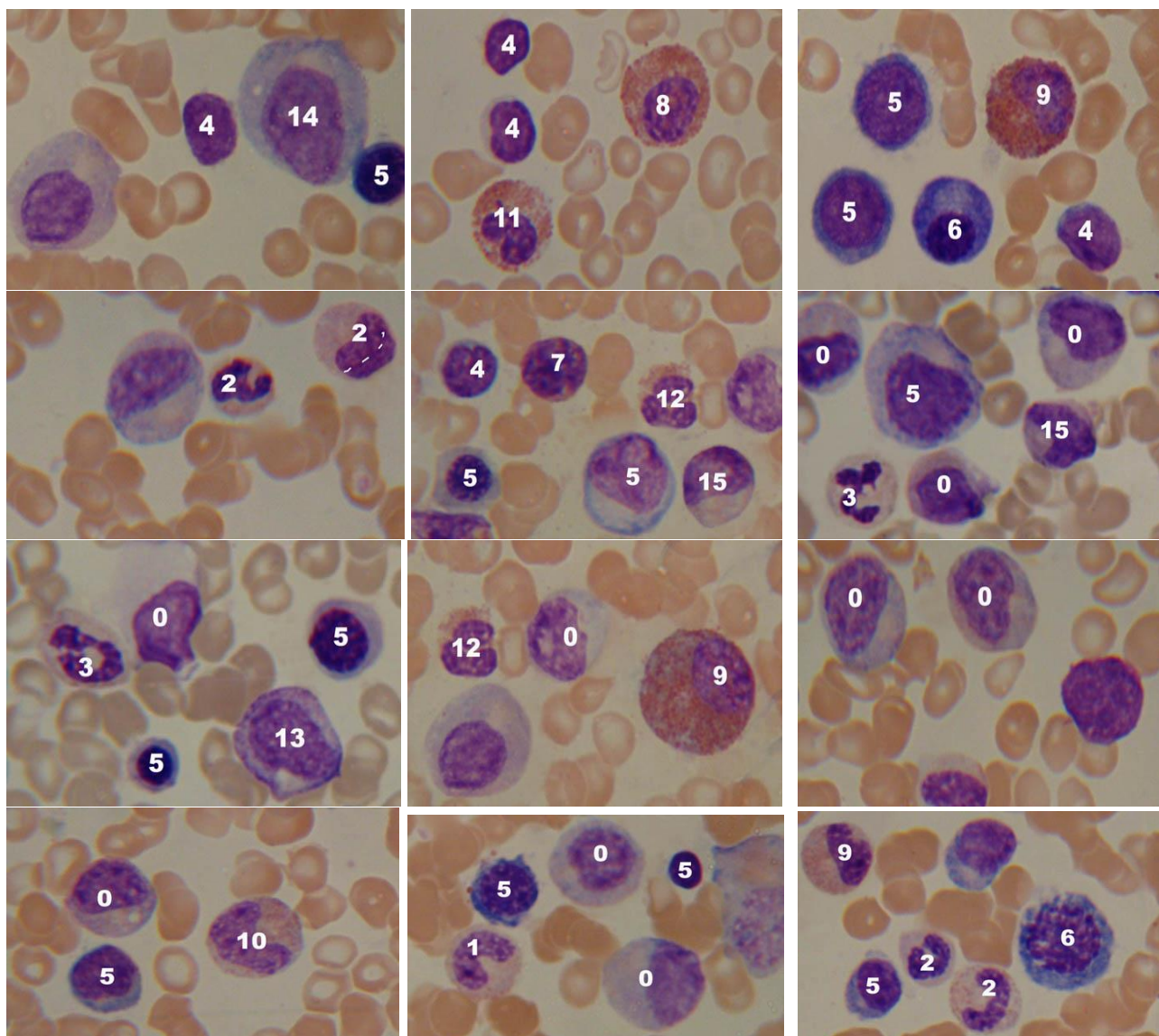


ЛИМФОЦИТЫ



МОНОЦИТЫ

ГЕМОЦИТОПОЭЗ



КРАСНЫЙ КОСТНЫЙ МОЗГ

0 – миелобласт; 1 - юный нейтрофил; 2 - палочкоядерный нейтрофил;
3 - сегментоядерный нейтрофил; 4 - малый лимфоцит; 5 – проэритробласт;
6 - базофильный эритробласт; 7 – полихроматофильный эритробласт;
8 - эозинофильный промиелоцит; 9 - эозинофильный миелоцит;
10 - эозинофильный метамиелоцит; 11 - палочкоядерный эозинофил;
12 - сегментоядерный эозинофил; 13 - базофильный промиелоцит;
14 – промоноцит; 15 – средний лимфоцит

Основная литература:

1. Гистология, цитология ва эмбриология. Под редакцией Ю.И. Афанасьева. Москва.Медицина, 2012 г.
2. Лекции.

Дополнительная литература:

1. Хэм А., Кормак Д. Гистология, 4-том, 49-92стр.
2. Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии ва эмбриологии.1999, 7-21 стр.
3. Гистология (введение в патологию). Под редакцией Э.Г. Улумбекова. Москва. ГЭОТАР.1999, 493-523стр.
4. Информация интернета по следующим сайтам:
 - <http://www.histology.narod.ru/>
 - <http://rsmu.ru/8894.html>
 - <http://www.dapamojnik.info/gist/>
 - <http://www.morphology.dp.ua/hist.php>
 - <http://histologyatlas.wisc.edu/>
 - <http://www.histology-world.com/>
 - <http://www.visualhistology.com/>
 - <http://www.bu.edu/histology/m/>

