

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«БАЙКАЛЬСКИЙ БАЗОВЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ»

**МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА**

**практического занятия**

**по дисциплине** МДК 05.01 Теория и практика лабораторных гистологических исследований

**тема занятия** Методы исследования клетки

**специальность** 31.02.03. Лабораторная диагностика

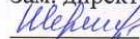
**курс** III

Методическая разработка составлена  
в соответствии с требованиями  
рабочей программы по ПМ. 05  
преподавателем Кокориным А. В.  
«\_21\_»\_\_\_\_\_10\_\_\_\_\_20\_18\_г.

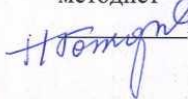
Селенгинск, 2018 г.

«Согласовано»

Зам. директора по УР

 Шереметова О.В.

методист

 Гончарова Н.А.

## План учебного занятия № 1

**Название** ПМ. 05МДК 05.01 Теория и практика лабораторных гистологических исследований

**Специальность** 31.02.03 Лабораторная диагностика

**Курс** III **Группа** 741

**Тема занятия** Методы исследования клетки

**Тип занятия** практическое (закрепление изученного материала)

**Преподаватель** Кокорин А.В.

**Цели:** С целью овладения указанным видом профессиональной деятельности и соответствующими профессиональными компетенциями студент в ходе освоения профессионального модуля должен:

### **Учебные**

#### **Знать:**

- правила взятия, обработки и архивирования материала для гистологического и гистохимического исследований;
- критерии качества гистологических и гистохимических препаратов;
- морфофункциональную характеристику тканей и органов человека.

#### **Уметь:**

- ознакомиться с методикой приготовления гистологических препаратов;

### **Формирование компетенций**

#### **Формируемые ОК:**

ОК 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск, анализ и оценку информации, необходимой для постановки и решения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

ОК 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

ОК 6. Работать в коллективе и в команде, эффективно общаться с коллегами, руководством, потребителями.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

#### **Формируемые ПК:**

ПК 5.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных гистологических исследований.

ПК 5.3. Регистрировать результаты гистологических исследований.

#### **Развивающие:**

- развивать клиническое и логическое мышление;
- формировать умение применять теоретические знания в практической деятельности;
- способствовать развитию умений анализировать, сравнивать, обобщать полученную информацию;
- стимулировать познавательную и мыслительную активность студентов;
- развивать умение обобщать и систематизировать изученный материал;

#### **Воспитательные:**

- развивать и стимулировать мотивацию к учению;
- воспитывать интерес к выбранной профессии, бережное отношение к лабораторному оборудованию, микропрепаратам;
- воспитывать профессионально значимые качества: аккуратность в работе, ответственность за конечный результат;

## **Интеграция темы**

Междисциплинарные связи: формирование ОК1, ОК2, ОК 4, ОК 6, ОК 13 происходит на дисциплинах общего гуманитарного и социально-экономического цикла, математического и общего естественнонаучного цикла, общепрофессиональных дисциплинах, профессиональных модулей и окончательно сформировываются на преддипломной практике и государственной итоговой аттестации.

ПК 5.1., ПК 5.3. формируются на таких дисциплинах, как математика, информационные технологии в профессиональной деятельности, анатомия и физиология человека, основы патологии, генетика человека с основами медицинской генетики, гигиена и экология человека, основы микробиологии и иммунологии, фармакология, психология, безопасность жизнедеятельности, закрепление происходит на таких дисциплинах как анатомия физиология человека, биология и окончательная сформированность происходит на производственной практике, преддипломной практике и государственной итоговой аттестации.

**Место проведения:** кабинет № 16

**Продолжительность:** 270 минут

**Оснащение:** ноутбук, телевизор, микропрепараты клетки, микроскопы;

**Источники информации**

**Литература:**

**Основная:**

1. Бойчук А.В. Гистология. Атлас для практических занятий. - Изд.: ГОЭТАР-Медиа, 2008
2. Данилов Р.К. Гистология человека. - Изд.: ЭЛБИ-СПб, 2004
3. Семченко В.В., Барашкова С.А., Артемьев В.Н. Гистологическая техника: учебное пособие. – Омск: Омская медицинская академия, 2004. – 115 с.
4. Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.Н., Артемьев В.Н. Гистологическая техника: учебное пособие. – 3-е изд., доп. и перераб. – Омск-Орел: Омская областная типография, 2006. – 290 с.

**Дополнительная:**

1. Афанасьев Ю.И. Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии и эмбриологии: Учебное пособие для мед.вузов / Ю.И. Афанасьев и др. / Под ред. Ю.И. Афанасьева, А.Н. Яцковского. – М.: Медицина, 2004. – 328 с.; ил
2. Гистология: Учебник / Ю.И.Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский и др.; Под ред. Ю.И.Афанасьева, Н.А. Юриной. – 5-е изд., перераб. доп. - М., Медицина, 2006. – 744 с.; ил.
3. КрстичРадивой В. Иллюстрированная энциклопедия по гистологии человека. / Р.В. Крстич – СПб.: СОТИС, 2007. – 536 с.; 1576 ил.
4. Кузнецов С.Л. Гистология, цитология и эмбриология. Учебник для студентов медицинских ВУЗов / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров. - Москва: МИА, 2007. – 600 с.; ил., табл.
5. Кузнецов С.Л. Лекции по гистологии, цитологии и эмбриологии / С.Л. Кузнецов, М.К. Пугачев. – Москва: МИА, 2004.
6. Самусев Р.П. Атлас по цитологии, гистологии и эмбриологии: Учебное пособие для студентов высшей мед.заведений / Р.П. Самусев, А.В. Смирнов. / Под ред. Р.П. Самусева. – 2-е изд., испр. – Москва: ООО «Издательство Оникс»; ООО «Издательство «Мир и Образование», 2006. – 400 с.; ил.
7. Улумбеков Э.Г. Гистология, эмбриология, цитология: учебник с приложением на компакт-диске. Изд.: ГЭОТАР- Медиа, 2007.

**Интернет-ресурсы:**

1. [http://Labx.narod.ru/documents/bases\\_histologic\\_methods.html](http://Labx.narod.ru/documents/bases_histologic_methods.html)
2. [http://www.medkursor.ru/biblioteka/potomorf\\_diagn/metody\\_gist\\_isslidov/1098.html](http://www.medkursor.ru/biblioteka/potomorf_diagn/metody_gist_isslidov/1098.html)
3. [www.tumor.su/diagnoztika/citometodi.html](http://www.tumor.su/diagnoztika/citometodi.html)
4. [www.primer.ru/manuals/cytology/methods.html](http://www.primer.ru/manuals/cytology/methods.html)

## Структурно – логическая схема практического занятия

№	Этапы занятия	Продолжительность	ООД преподавателя	ООД студента	Приложения
1	Организационный момент	2 мин	Преподаватель приветствует студентов, отмечает отсутствующих, проверяет готовность группы к занятию	Приветствуют преподавателя	
2	Сообщение плана урока	3 мин	Преподаватель сообщает тему, цель, ход занятия, мотивирует на изучение темы	Слушают, записывают тему занятия	Приложение № 1
3	Контроль знаний	20 мин	Тестирование по материалам лекции "Введение. Морфофункциональные особенности клеточных структур", проверка результатов методом взаимоконтроля	Отвечают на вопросы теста, проверяют результаты	Приложение № 2
4	Практическая часть	210 мин	Рассказывает содержание методики, предлагает студентам прослушать, и заполнить соответствующую строку в таблице "Общая характеристика методов окраски клетки", опрашивает студентов, побуждает студентов сделать обобщение и самостоятельные выводы по таблице.	Слушают содержание методики, заполняют соответствующую строку в таблице "Общая характеристика методов окраски клетки", отвечают на вопросы, делают обобщение и самостоятельные выводы по таблице. Проводят микроскопирование гистологическ	Приложение № 4, 5

			Предлагает провести микрофотографирование гистологических препаратов и регистрацию изображения в тетради, наблюдает за работой студентов, оценивает, комментирует.	их препаратов и регистрацию изображения в тетради.	
5	Закрепление темы	25 мин	Тестирует методом заполнения кроссворда	Заполняют кроссворд	Приложение № 6
6	Домашнее задание, задание СРС	5 мин	Разъясняет, дает алгоритм выполнения домашнего задания, срс	Слушают, записывают	Приложение № 7
7	Подведение итогов	5 мин	Комментирует и выставляет оценки, проводит рефлексию	Слушают	Приложение № 8

## План лекции:

1. Проверка домашнего задания - составление конспекта по теме «Гистологические методы исследования клетки», студентам предлагается прочитать учебник Афанасьев Ю.И. Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии и эмбриологии: Учебное пособие для мед.вузов / Ю.И. Афанасьев и др. / Под ред. Ю.И. Афанасьева, А.Н. Яцковского. – М.: Медицина, 2004. – 26-27 с.;
2. Тестирование по материалам лекции «Введение. Морфофункциональные особенности клеточных структур», проверка результатов методом взаимоконтроля
3. Практическая часть: Знакомство с методиками окрашивания клетки, тема: «Методы исследования клетки»  
 Преподаватель предлагает прослушать, а затем записать методы окраски при помощи методического пособия. После фиксирования учебного пособия в рабочем дневнике, преподаватель просит студентов поучаствовать в коллективном разборе методов окраски гистологических препаратов разобрать методы при помощи таблицы "Общая характеристика методов окраски клетки".
  - а Выявление ДНК по методу Фельгена.
  - б Метод выявления РНК по Унне—Паппен-гейму
  - в Выявление нуклеиновых кислот по Эйнарсону.
  - г Выявление α-аминокислотнингидриновой реакцией по Ясума и Ичикава
  - д Окрашивание гликогена методом реактив Шиффа—йодная кислота в модификации А. Л. Шабадаша. О
  - е крашивание липидов Суданом III.
  - ж выявление АТФазы по методу Вахштейна—Мейзеля.
- з Закрепление теоретического материала методом групповой организация (заполнение таблиц).
4. Микроскопирование гистологических препаратов (студентам предлагается рассмотреть в микроскоп гистологические препараты а, затем зарисовать их в тетрадь).
5. Выходной контроль (решение кроссвордов) при помощи кросворда им предлагается закрепить пройденный материал на занятии, и при помощи вспомогательного материала презентации угадать методы окраски.
6. Домашнее задание, Самостоятельная работа Составить конспект «История методов окрашивания гистологических препаратов», студентам предлагается прочитать тему: Изучение морфологических особенностей клеточных структур. Функциональное значение клеточных структур. Фазы митоза.учебник Афанасьев Ю.И. Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии и эмбриологии: Учебное пособие для мед.вузов / Ю.И. Афанасьев и др. / Под ред. Ю.И. Афанасьева, А.Н. Яцковского. – М.: Медицина, 2004. – 328 с.;
7. Обобщение, оценка работы студентов, подведение итогов.

**Тема: Гистологические методы исследования клетки**

**I Вариант**

Инструкция: выберите один правильный ответ

1. Какие функции выполняет оболочка клетки?
  1. пищеварительную
  2. экзоцитоз
  3. упаковка веществ
  4. выделительную
2. Какое строение имеют митохондрии?
  1. микротрубочки
  2. мембраны
  3. рибосомы
  4. поры
3. Функция микротрубочек?
  1. выделительная
  2. транспортная
  3. секреторная
4. Чем представлена гранулярная эндоплазматическая сеть?
  1. трубочки
  2. гранулы
  3. хромосомы
5. Какие функции выполняет комплекс Гольджи?
  1. синтез белка
  2. синтез АТФ
  3. эндоцитоз
  4. транспортная
  5. пищеварительная
  6. пиноцитоз
6. Из чего состоят органоиды?
  1. внутренняя мембрана и наружная мембрана, центриоли
  2. микротрубочек
  3. крист
  4. матриксы
  5. рибосомы
7. Функции ядра клетки?
  1. клеточное дыхание
  2. пищеварительная
  3. деление клетки
  4. транспортная
8. Какой органоид клетки выполняет пищеварительную функцию?
  1. ядро
  2. лизосомы
  3. эндоплазматическая сеть
  4. митохондрии



9. Что означает слово пролиферация

1. метастазирование
2. размножение клеток
3. регенерация клетки
4. деление клеток

10. Какой органоид клетки выполняет синтез АТФ?

1. митохондрии
2. комплекс Гольджи
3. лизосомы
4. Эндоплазматическая сеть

### **Тема: Гистологические методы исследования клетки**

#### **II Вариант**

Инструкция: выберите один правильный ответ

1. Какие функции выполняет ядро клетки?

1. синтез белка
2. синтез АТФ
3. эндоцитоз
4. транспортная
5. пищеварительная
6. пиноцитоз
7. наследственная информация

2. Из чего состоит оболочка клетки?

1. внутренняя мембрана, наружная мембрана
2. центриолей
3. микротрубочек

3. Из чего состоит клеточный центр?

1. центриоли, перетяжка
2. рибосомы
3. микротрубочки

4. Какие функции выполняет клеточная митохондрия?

1. синтез АТФ
2. синтез белков
3. синтез углеводов
4. синтез липидов
5. эндоцитоз

5. Из чего состоит комплекс Гольджи?

1. цистерн
2. кристы
3. секреторных гранул
4. вакуолей

6. Какую форму имеют лизосомы?

1. бобовидную
2. округлую
3. калошевидную
4. конусовидную

7. Функция эндоплазматической сети?

1. синтез АТФ
2. синтез белков
3. синтез углеводов
4. синтез липидов

8. Какую функция выполняют рибосомы?

1. синтез АТФ
2. синтез белков
3. синтез углеводов
4. синтез липидов

9. Какую функция выполняют лизосомы?

1. пищеварительная
2. фагоцитоз
3. транспорт веществ
4. энергетическая
5. обмен белков

10. Какие функции выполняет клеточная оболочка?

6. синтез АТФ
7. синтез белков
8. синтез углеводов
9. синтез липидов
10. эндоцитоз

**Тема: Гистологический методы исследования клетки**

Эталон тест – контроля

**1 вариант**

- 1. 2
- 2. 2
- 3. 2
- 4. 1
- 5. 4
- 6. 1
- 7. 3
- 8. 2
- 9. 2
- 10. 1

**2 вариант**

- 1. 7
- 2. 1
- 3. 1
- 4. 1
- 5. 1
- 6. 2
- 7. 2
- 8. 2
- 9. 1
- 10. 5

**Критерии оценки на тестовые задания**

<b>Ошибки (в %)</b>	<b>Оценка</b>
100 - 90	5
89-80	4
79-70	3
менее 70	2

## Методики окрашивания клетки

### Выявление углеводного компонента ДНК по Фельгену

Принцип этого метода выявления ДНК заключается в том, что в результате мягкого гидролиза под влиянием 1 н. соляной кислоты в фиксированных препаратах происходит специфическое отщепление от ДНК пуриновых оснований (аденина и гуанидина), связанных с С-атомом дезоксирибозы. Удаление пуриновых оснований раскрывает потенциальные альдегидные группы, которые после этого способны реагировать с реактивом Шиффа и образовывать кислотостойкий краситель красно-фиолетового цвета. Образовавшийся окрашенный комплекс очень стабилен. Фуксин может быть экстрагирован из соединения только после обработки горячими кислотами или щелочами. Метод Фельгена прост и надежен, но условия кислотного гидролиза играют в нем решающую роль. Продолжительный гидролиз приводит к ослаблению окрашивания, причиной которого может быть деполимеризация и экстрагирование ДНК, а также химические изменения. Оптимальная продолжительность кислотного гидролиза 1 н. соляной кислотой при 60 °С определяется выбором фиксатора.

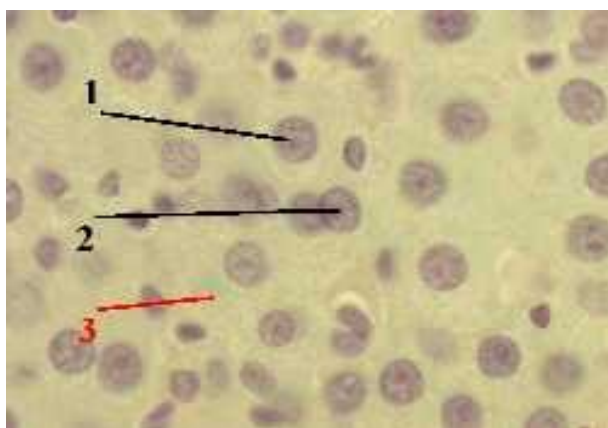
Ингредиенты	Экспозиция
Нейтральный 10 % формалин	8 мин
Жидкость Карнуа	8 мин
Формалин-спирт-уксусная кислота	7 мин
Спирт 80 %	5 мин
Жидкость Буэна	22 мин
Жидкость Ценкера	5 мин

2. а) На снимке мы видим, что, действительно, в ядрах (1) клеток содержится ДНК.

б) Исключения составляют ядрышки (2):

в них содержание ДНК низкое,

отчего они, как и цитоплазма (3), имеют на препарате *зелёный цвет*.



При обследовании указанных условий гидролиза РНК практически полностью вымывается из срезов, поэтому не происходит образования альдегидов из рибозы и при правильном проведении реакции Фельгена РНК всегда остается неокрашенной.

Стандартная реакция Фельгена

1. Материал фиксируют одним из перечисленных фиксаторов, заливают в парафин или готовят мазки суспензированных клеток.
2. Срезы депарафинируют и через ряд спиртов убывающей концентрации доводят до воды.
3. Быстро промывают в холодной 1 н. соляной кислоте.
4. Помещают при 60 °С в 1 н. соляную кислоту на оптимальное время гидролиза (от 8 до 22 мин). Хорошие результаты дает также гидролиз в 5 н. соляной кислоте при 37 °С.
5. Быстро промывают в 1 н. соляной кислоте, затем в дистиллированной воде.
6. Переносят в реактив Шиффа на 45 мин.
7. Промывают в 3 сменах свежей смеси, состоящей из 5 мл 10 % пиросульфата калия, 5 мл 1 н. соляной кислоты, дистиллированной воды до 100 мл) по 2 мин в каждой.
8. Промывают в дистиллированной воде 2 мин.
9. Возможна окраска 1 % водным раствором светло-зеленого (1 мин) или 0,5 % спиртовым раствором прочного зеленого 1 мин.
10. Обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации, проводят через ксилол, заключают в бальзам.

Результат:

структуры, содержащие ДНК, окрашиваются в красно-лиловый цвет.

После обработки дезоксирибонуклеазой реакция отрицательна.

### **Окраска по Паппенгейму**

**На нефиксированные мазки**, уложенные на мостик, пипеткой наливают на 2—3 минуты по 12—15 капель выпускаемого нашей химической промышленностью фиксатора-красителя типа Май-Грюнвальда. Фиксатор-краситель представляет собой раствор сухой краски (эозин-метиленовая синька) в метаноле.

Мазки крови одновременно фиксируются и частично окрашиваются. Затем к краске на стекле добавляют столько капель дистиллированной воды, сколько было взято капель краски, и оставляют на 1 минуту.

Не сливая краски, ее смывают струей воды, сливают с препарата воду и наливают на стекло раствор краски Романовского (1—1 1/2 капли на 1 мл воды) и красят 15—20 минут. Смывают краску и сушат препараты. Этот способ окраски особенно четко выявляет структуру ядер и зернистости лейкоцитов

### **Выявление нуклеиновых кислот с использованием галлоцианина и хромовых квасцов**

При больших значениях рН галлоцианином и хромовыми квасцами окрашиваются все базофильные структуры. Специфически нуклеиновые кислоты окрашиваются при рН 0,8—1,75. Метод выявляет одновременно ДНК и РНК. Если необходимо выявить только ДНК или только РНК, срез предварительно обрабатывают рибонуклеазой (как указано выше) или дезоксирибонуклеазой. Последнюю растворяют в фосфатном буфере рН 6,5—7,0 в концентрации 0,2 мг/мл и в качестве активатора добавляют хлорид магния в концентрации 0,2 М. Обработку производят при температуре 37° С в течение 4—6 ч. К фиксации особых требований нет, но не следует употреблять фиксаторы, содержащие ртуть или бихромат.

**Приготовление раствора:** 5 г хромовых квасцов ( $K_2SO_4Cr_2 [SO_4]_3 \cdot 24 H_2O$ ) растворяют в 100 мл дистиллированной воды, прибавляют 0,15 г галлоцианина; раствор кипятят в

течение 5 мин, охлаждают, фильтруют и фильтрат доводят дистиллированной водой до 100 мл. Приготовленный раствор имеет pH 1,64 и, следовательно, вполне подходит для выявления нуклеиновых кислот. Раствор пригоден в течение длительного времени.

**Методика проведения реакции:** 1) депарафинированные парафиновые срезы из дистиллированной воды переносят в раствор галлоцианина и хромовых квасцов и окрашивают в течение 48 ч при комнатной температуре; 2) промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой; 3) обезвоживают в спиртах, просветляют в ксилоле, заключают в бальзам.

Результат реакции: нуклеиновые кислоты окрашиваются в серовато-синий цвет.

### **Выявление альфа-аминокислотнингидриновой реакцией по Ясума и Ичикава**

Пригоден материал, фиксированный любым способом. Необходимые растворы:

0,5% раствор нингидрина в абсолютном спирте или 1% раствор аллоксана.

**Методика проведения реакции:** 1) депарафинированные срезы переносят из дистиллированной воды в раствор нингидрина или аллоксана и выдерживают 16—24 ч при температуре 37° С; 2) промывают водопроводной водой в течение нескольких минут; 3) проводят обработку реактивом Шиффа в течение 15—30 мин; 4) промывают в водопроводной воде 10 мин; 5) обезвоживают в спиртах, заключают в ксилол, бальзам.

**Результат:** белки окрашиваются в цвета от розового до красно-фиолетового.

### **Окрашивание Суданом III.**

Является наиболее распространенным методом выявления жира.

Приготовление раствора красителя.

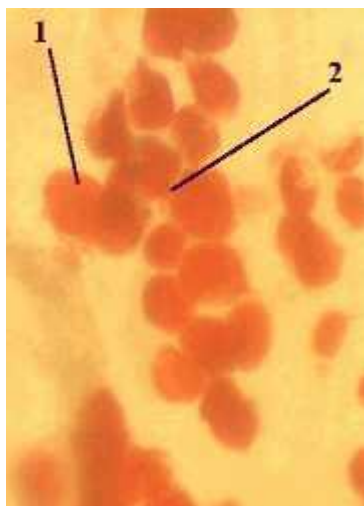
В 100 мл горячего 70% спирта засыпают 0,2—0,3 г порошка судана III, несколько раз взбалтывают и ставят в термостат (при 58°С) на несколько часов, затем охлаждают и фильтруют.

Метод.

1. Замороженные срезы (из свежей или фиксированной в формалине ткани) на несколько минут переносят из воды в 50% спирт.
2. Помещают в спиртовой раствор красителя на 15—30 мин (бюксы следует закрывать, так как испарение спирта приводит к выпадению осадков красителя).
3. Быстро ополаскивают в 50% спирте.
4. Промывают в дистиллированной воде.
5. Подкрашивают ядра кислым гемалауном.
6. Промывают и заключают в желатин или глицерин-желатин (обезвоживание в спиртах экстрагирует жиры).

Результат.

Жировые вещества интенсивно оранжевого цвета, ядра — синие. Препараты выцветают сравнительно скоро, поэтому откладывать исследование не рекомендуется.



#### 1.1.2.4. Окрашивание препаратов и заключение в консервирующую среду

1. Перед окрашиванием образцы освобождают от парафина, проводя по батарее растворителей:

- ксилол, спирт 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 60 %, вода (по 2-5 мин)

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

2. Для окрашивания предметные стёкла со срезами

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

3. Препарат

- опять обезвоживают (проводя по батарее спиртов с возрастающей концентрацией),
- а затем просветляют (в карбол-ксилоле и ксилоле) - для удаления лишней краски.

4. Наконец, на препарат наносят каплю канадского бальзама (в случае среза) или кедрового масла (на мазки крови) и накрывают покровным стеклом.

#### 1.1.2.5. Мазки и тотальные препараты: особенности приготовления

1. Примеры тотального препарата - участки сальника или мягкой мозговой оболочки, растянутые на предметном стекле.

2. В подобных случаях, а также при приготовлении мазков, из 4-х перечисленных в п. 1.1.2. этапов опускаются два -

- уплотнение материала и
- приготовление среза (с последующим освобождением от уплотнителя).

3. Остаются:

- фиксация,
- окраска и
- заключение в консервирующую среду.

● В остальных же случаях (т.е. при получении срезов) приготовление гистологического препарата - весьма долгая и трудоёмкая процедура.

● Но при правильном её выполнении полученный препарат может храниться неопределённо долгое время.

### 1.1.3.1. Типы красителей

Все красители, используемые в гистологической технике, подразделяются на 3 типа.-

Тип красителя	Пример	Окрашиваемые структуры
Кислые красители	<p>Кислоты и кислые соли :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● эозин (искусственная краска; название - от греч.эос - заря);</li> <li>● кислый фуксин.</li> </ul>	<p>а) Окрашиваемые структуры называются оксифильными(имеющими сродство к кислым красителям).</p> <p>б) Это белковые компоненты цитоплазмы и неклеточные структуры (коллагеновые волокна).</p>
Основные красители	<p>Основные соли :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● гематоксилин (точнее, продукт его окисления - гематеин);</li> <li>● азур 2, кармин.</li> </ul>	<p>а) Красящиеся структуры - базофильные (сродство к основным красителям).</p> <p>б) Это структуры, богатые нуклеиновыми или иными кислотами -</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● ядра,</li> <li>● рибосомы,</li> <li>● аморфный компонент межклеточного вещества.</li> </ul>
Нейтральные красители	<p>Смесь двух красителей:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● основного (азур 2) и</li> <li>● кислого (эозин).</li> </ul>	<p>а) Структуры, воспринимающие кислые красители, окрасятся эозином;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● пример - специфические гранулы в эозинофильных лейкоцитах.</li> </ul> <p>б) Ядра всех клеток окрашиваются азуром 2.</p>
Индиферентные красители	<p>Судан III, судан IV</p>	<p>Суданом окрашиваются жировые капли (в которых он растворяется).</p>

Существует большое количество различных способов окраски.

Те из них, которые встречаются в нашем курсе, перечислены ниже.

### 1.1.3.2. Общие методы окраски

1. Окраска гематоксилин -	1.а) Самый распространённый метод окраски.
---------------------------	--



<p>эозином</p>	<p>б) Сочетает основной и кислый красители.</p> <p>в) Поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие неклеточные структуры.</p> <p>2. Ядра приобретают сине-фиолетовый цвет, цитоплазма - желтовато-розовый цвет.</p> <p>3. Замечание: используемый гематоксилин готовится по методу Эрлиха: окисляется до гематеина калийными квасцами.</p>
<p>2. Окраска железным гематоксилином (по методу Генденгайна)</p>	<p>1. Препарат</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● предварительно обрабатывают (протравляют) железноаммиачными квасцами,</li> <li>● а потом обрабатывают гематоксилином.</li> </ul> <p>2. Структуры приобретают коричневатого-серый цвет.</p> <p>3. Хорошо выявляются</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● структуры ядра,</li> <li>● границы клеток,</li> <li>● мышечные волокна.</li> </ul>

### 1.1.3.3. Выявление неклеточных структур соединительной ткани

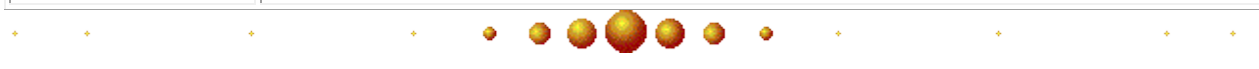
<p>1. Окраска по методу ванГизона</p>	<p>а) Краситель - смесь растворов пикриновой кислоты и кислого фуксина.</p> <p>б) Коллагеновые волокна (содержащиеся в межклеточном веществе соединительной ткани) окрашиваются в ярко-красный цвет, ● а элементы других тканей (напр., мышечные волокна) - в жёлтый цвет.</p>
<p>2. Окраска по методу Маллори</p>	<p>1. Краситель является трёхцветным: это смесь</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● кислого фуксина,</li> <li>● анилинового синего,</li> <li>● оранжевого G,</li> </ul> <p>а также двух кислот.</p> <p>2.а) Коллагеновые волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-синий цвет;</p> <p>б) многие другие структуры (ядра, мышечные волокна, эритроциты)</p>

	- в оранжевый или красный цвет.
3.Импрегнация серебром	<p>1. а) Препарат обрабатывают аммиачным раствором серебра, а затем - восстановителями.</p> <p>б) В итоге, выделяющееся серебро осаждается на определённых волокнах соединительной ткани. –</p> <p>2. ● Ретикулярные (аргирофильные) волокна приобретают чёрный цвет,  ● коллагеновые волокна - коричневый,  ● ядра клеток - светло-коричневый.</p>
4. Окраска орсеином	<p>● Эластические волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-красный цвет;</p> <p>● остальные структуры - в слабо-розовый цвет.</p>
5. Окраска гематоксилин-пикрофуксином	<p>● Эластические волокна окрашиваются пикриновой кислотой в жёлтый цвет,</p> <p>● коллагеновые волокна - в красный цвет,</p> <p>● ядра клеток - окрашиваются гематоксилином в тёмно-фиолетовый цвет.</p>
6. Окраска по методу Шморля	<p>1. Используется для окраски костей и дентина.</p> <p>2. а) Предварительно кусочки материала  ● подвергают декальцинации (с помощью кислоты),  ● а затем выдерживают в растворе алюмокалиевых квасцов.</p> <p>б) Краситель - раствор тионина.</p> <p>3. а) Стенки костных полостей и каналцев (выстланные сетью коллагеновых волокон) окрашиваются в тёмно-коричневый цвет;</p> <p>б) остальной фон - светло-коричневый.</p>

#### 1.1.3.4. Окраска клеток соединительной ткани и крови

1. Окраска азур 2 – эозином	<p>● Базофильные элементы окрашиваются азуром 2 в тёмно-синий,</p> <p>● а оксифильные - в светло-красный цвет.</p>
--------------------------------	--

<p>2. Окраска мазков по методу Романовского</p>	<p>1. а) Краситель - тот же, что и в предыдущем случае (азур 2 – эозин).</p> <p>б) Отличия же от приготовления срезов таковы:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● фиксацию мазков проводят чистым метанолом;</li> <li>● окрашивание продолжают всего 30-45 мин, а не 12-14 ч;</li> <li>● для заключения под покровное стекло используют кедровое масло, а не канадский бальзам.</li> </ul> <p>2. ● Эритроциты приобретают бледно-красный цвет,</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● цитоплазма лейкоцитов - голубой или синий цвет,</li> <li>● цитоплазматические гранулы окрашиваются в зависимости от их природы.</li> </ul>
---	---



### 1.1.3.5. Выявление элементов нервной системы

<p>1. Импрегнация нитратом серебра</p>	<p>1. Особенности предварительной обработки препарата.-</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Фиксацию материала в формалине проводят не менее 7 дней.</li> <li>● Уплотнение образца осуществляют не путём заливки в парафин (или целлюлозу), а путём замораживания.</li> <li>● Срез готовят на специальном замораживающем микротоме.</li> </ul> <p>2. При окрашивании срез последовательно обрабатывают растворами</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● азотнокислого серебра,</li> <li>● формалина,</li> <li>● аммиачного серебра.</li> </ul> <p>3. а) Элементы нервной системы (волокна, клетки и т.д.) окрашиваются в чёрный цвет, б) окружающие ткани - в светло-коричневый цвет.</p>
<p>2. Окраска толуидиновым синим по методу Ниссля</p>	<p>1. Толуидиновый синий окрашивает умеренно базофильные соединения в синий цвет.</p> <p>2. С его помощью в цитоплазме нервных клеток обнаруживаются глыбки базофильного вещества (т.н. субстанция Ниссля).</p>
<p>3. Окраска метиловым зелёным-пиронином по</p>	<p>1. Метод служит для выявления РНК.</p> <p>2. а) Как и предыдущий метод, относится к гистохимическим методам исследования.</p>

методу Браше	б) Поэтому подробней описывается ниже.
--------------	--

#### 1.1.4. Гистохимические методы исследования


а) Гистохимические методы основаны на специфической реакции между химическим реактивом и определённым компонентом препарата.

б) Образующийся продукт реакции имеет окраску, отличную от окраски исходного реактива.

1а) РНК	<p>Реакция Браше.</p> <p>1. Реактив (как отмечалось, - смесь двух красителей: метилового зелёного и пиронина.</p> <p>2. а) А. Пиронин специфически окрашивает РНК в красный цвет. Б. Поэтому на препарате ядрышки (в составе ядра) и рибосомбогатые участки цитоплазмы имеют красный цвет.</p> <p>б) Другие структуры ядра (помимо ядрышек) - зелёные.</p> <p>3. Обычно делают и контрольный препарат, который перед окрашиванием обрабатывают рибонуклеазой.</p>
1б) ДНК	<p>Реакция Фёльгена.</p> <p>1. Основной реактив - фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа).</p> <p>2. ДНК-содержащие структуры окрашиваются в пурпурно-красный цвет.</p>
2. Белки	<p>Используются различные реакции; в том числе:</p> <p>а) с бромфеноловым синим (у белков - тёмно-фиолетовая окраска); б) со смесью нингидрин-реактив Шиффа (белки приобретают красный цвет).</p>
3а) Полисахариды	<p>ШИК-реакция.</p> <p>1. Реактив - Шифф-периодная кислота (выделенные буквы и составляют аббревиатуру ШИК).</p> <p>2. Периодат способствует образованию в субстрате альдегидной группы, которая взаимодействует с реактивом Шиффа.</p> <p>3. На препарате ШИК-положительные компоненты (например, гранулы гликогена) имеют тёмно-красный цвет.</p>

<p>3б) Гликозамин-гликаны</p>	<p>Реакция с толуидиновым синим.</p> <p>1. При взаимодействии толуидинового синего с веществами, содержащими много кислотных групп, наблюдается метахромазия - изменение окраски с синей на фиолетовую и красную.</p> <p>2. Подобным свойством обладают, в частности, компоненты аморфного вещества соединительной ткани - гликозамингликаны (являющиеся, как известно, гетерополисахаридами с высоким содержанием кислотных радикалов).</p>
<p>4. Нейтральный жир</p>	<p>Реакция с суданом III (о которой уже упоминалось).</p> <p>Капли жира в жировой клетке окрашиваются в яркий оранжево-красный цвет благодаря растворению в них красителя.</p>

#### 1.1.5.1. Срез; окраска гематоксилин-эозином

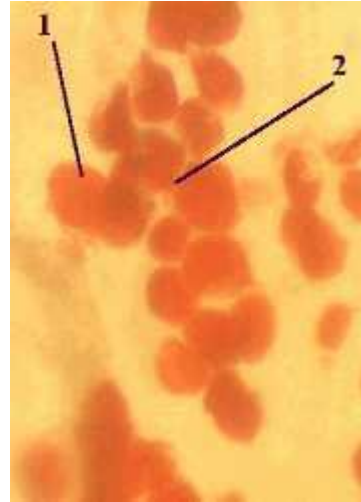
<p>1. Препарат - тонкая кишка собаки. Окраска гематоксилин-эозином.</p> <p>1. На снимке мы видим внутреннюю поверхность тонкой кишки с находящимися на ней кишечными ворсинками (1).</p> <p>2. а) Ядра клеток (2) - базофильны и окрашены гематоксилином в фиолетовый цвет.</p> <p>б) Цитоплазма (3) оксифильна и окрашена эозином в розовый цвет.</p>	 <p><u>Полный размер</u></p>
--	--

#### 1.1.5.2. Тотальный препарат: окраска судан III - гематоксилином

<p>2. Препарат - белая жировая ткань. Тотальный препарат сальника. Окраска судан III - гематоксилином.</p> <p>1. а) Препарат является тотальным.</p>	
--	--

б) Это означает, что перед нами - не срез органа, а участок сальника, растянутого на предметном стекле.

2. а) Жировые клетки на препарате заполнены крупными каплями жира (1), которые окрашены суданомШ в ярко-оранжевый цвет.



Полный размер

б) Клеточные ядра (2), окрашенные гематоксилином в фиолетовый цвет, оттеснены к периферии клетки.

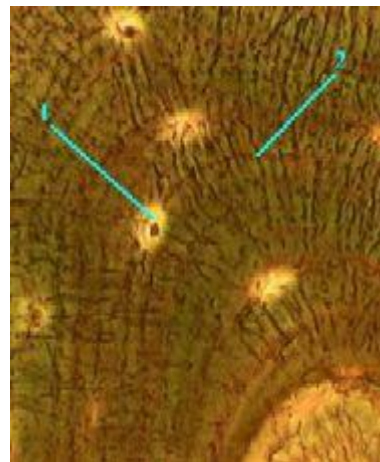
#### 1.1.5.3. Срез после декальцинации; окраска по Шморлю

3. Препарат - пластинчатая костная ткань. Поперечный срез трубчатой кости. Окраска по методу Шморля.

1. В процессе изготовления препарата костный материал подвергнут декальцинации (п. 1.1.3.3).

2. Применённый метод окраски позволяет выявить стенки костных полостей (1) и канальцев (2), окрашивающиеся в тёмно-коричневый цвет благодаря высокому содержанию здесь коллагеновых волокон.

3. В костных полостях находятся тела костных клеток (остеоцитов), а в канальцах - отростки этих клеток.



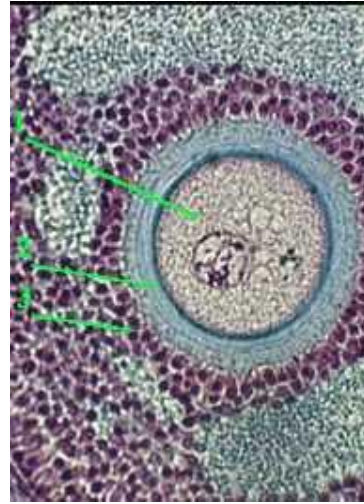
Полный размер

#### 1.1.5.4. Срез; окраска по Маллори

4. Препарат - срез яичника кролика. Окраска по методу Маллори.

1. В методе Маллори используются 3 красителя (п. 11.3.3), что делает картину многоцветной.

2. На снимке - женская половая клетка (ооцит), находящаяся в фолликуле яичника.
3. Цитоплазма (1) клетки окрашена в розовый, окружающая её блестящая оболочка (2) - в голубой, а ядра фолликулярных клеток (3) - в фиолетовый цвет.



Полный размер

1

### 1.2.2. Особенности приготовления препарата

<p>1. Взятие материала и фиксация</p>	<p>Материал берут очень маленькими кусочками (порядка 1 мм<sup>3</sup>), а фиксацию осуществляют обычно в 2 стадии:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● вначале глутаральдегидом (стабилизация белков),</li> <li>● затем - четырёхокисью осмия (стабилизация фосфолипидов и контрастирование ткани).</li> </ul>
<p>2. Уплотнение материала</p>	<p>1. Образцы, как обычно, обезвоживают, а для их дальнейшего уплотнения используют эпоксидные смолы .</p> <p>2. а) Заливку производят в специальных формах, б) затвердевание смеси происходит путём её полимеризации в термостате, в) и затвердевшие блоки имеют вид маленьких свечей.</p>
<p>3. Приготовление срезов</p>	<p>1. Срез делают с помощью ультратома; их толщина - 30-50 нм (ср. с микротомными срезами - 10.000 – 20.000 нм).</p> <p>2. Затем их переносят на сеточки (играющие роль предметного стекла).</p>
<p>4. Окрашивание</p>	<p>1. а) Окрашивание срезов сводится к их контрастированию с</p>

срез

помощью солей тяжёлых металлов (свинца, вольфрама, урана).

б) Эти соли осаждаются на фосфолипидах мембран и поглощают электроны.

2. Поэтому соответствующие места клетки выглядят более тёмными.









## Эталон заполнения таблицы

## Общая характеристика методов окраски клетки

Название метода	Что окрашивает		Основные ингредиенты		Результат реакции	
	Заполняется студентом	Контроль	Заполняется студентом	Контроль	Заполняется студентом	Контроль
Метод Фельгельна		Днк		Реактив Шиффа Серно-кислая вода		Ядра окрашиваются в Красный цвет
Метод Унне-Папенгейма		РНК		Метиловый зеленый		структуры, содержащие ДНК, окрашиваются в красно-лиловый цвет.
Метод по Эйнарсону		Выявляет нуклеиновые кислоты		Хромовые квасцы		Нуклеиновые кислоты окрашиваются в серовато- синий цвет
Выявление α-аминокислотнингидриновой реакцией по Ясума и Ичикава		Выявляет альфа аминокислоты		Раствор нингидрина1% и аллоксана%		Белки окрашиваются от ярко-розового до фиолетового
Окрашивание гликогена методом реактива Шиффа		гликоген		Периодата калия		Окрашивается в красный цвет
Судан 3		жир		Раствор судана 3		Жир окрашивается в оранжевый цвет, ядра синие
выявление АТФазы по методу Вахштейна—Мейзеля		АТФ азы		Двунариевая соль, сульфат магния		Места АТФ азнойактивност окрашиваются в коричневый цвет



по горизонтали

1. Время выдержки для окраски препарата
2. Реактив используемый для окраски жиров

по вертикали:

- 1.Фамилия ученого разработавшего метод выявления нуклеиновых кислот
2. Фамилия ученого разработавшего метод окраски РНК
- 3.Полисахарид встречающийся как включение в цитоплазме клетки
- 4.Фамилия японского ученого разработавшего метод выявления аминокислот в клетке.

#### Критерии оценки кроссворда

<b>Ошибки</b>	<b>Оценка</b>
0-1	5
2	4
3	3
более 3	2

**Оценочная карта**

Ф.И.О	1 этап (внешний вид)	2 этап входной контроль	3 этап (заполнение дневников)	4 этап выходной контроль (кроссворды)	Итог

**Домашнее задание к практическому занятию № 2**

**Тема: «Гистологическое исследование эпителиальной ткани».**

**Обратить внимание на:**

1. Гистологическое исследование однослойного и многослойного эпителия.
2. Гистологическое исследование железистого эпителия.

**2. Вопросы для повторения**

**Знать методы окраски клетки и органоидов.**

**Литература**

Афанасьев Ю.И. Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии и эмбриологии: Учебное пособие для мед.вузов / Ю.И. Афанасьев и др. / Под ред. Ю.И. Афанасьева, А.Н. Яцковского. – М.: Медицина, 2004, с.

**3. Задание СРС по теме**



**Задание СРС по теме «Оценка функционального состояния пациента»****Самоанализ урока**

Тема урока: «.....». По программе обучения данная тема входит в раздел «.....» МДК .... «.....».

Это по типу ... урок, он включал в себя ... этапов: .... Основным этапом был ... , задачи ... этапа – ... , а ... этапа – ... . При проведении урока я ориентировалась на принципы обучения: .... Чтобы решить цель урока, я подобрала ... (содержание: примеры, вопросы, задание). Материал урока оказался ... (сложным, легким, интересным для студентов). На ...этапе урока я использовала ... (какие?) методы обучения, потому что .... На этапе ... – ... (какие?) методы. В ходе урока на ... этапе была организована ... (индивидуальная, фронтальная, групповая, коллективная), а на ... этапе ... работа студентов, потому что .... Задания ... были ориентированы на развитие ... студентов. Руководство преподавателя при выполнении ... заданий было ... ( оперативным, инструктирующим), потому что .... Студенты имели возможность выбора .... Распределение времени было .... Темп урока .... Мне было ... (легко ...) вести урок, студенты ... включались в работу .... Меня порадовали ... , удивили ... , огорчили ... (кто из студентов?), потому что .... Записи на доске .... Наглядный материал (другие средства обучения) ....Цель урока можно считать: ..., план урока: ..., материал ...; я полагаю, что (все) научились ..., потому что .... Домашнее задание (не) вызовет затруднения у ... учеников, потому что .... В целом урок можно считать

Спасибо, я готов(а) ответить на ваши вопросы.