

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт медицины, экологии и физической культуры  
Экологический факультет  
Кафедра биологии, экологии и природопользования

*С.М. Слесарев, Ю.В. Саенко*

## **МЕТОДЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

*Методические указания  
по выполнению лабораторных работ и самостоятельной  
работы  
для бакалавров направления подготовки 06.03.01 Биология*

Ульяновск  
2019

**УДК 576**  
**ББК 28.070**  
**С47**

*Печатается по решению Ученого совета ИМЭиФК  
Ульяновского государственного университета*

**Рецензент** - кандидат биологических наук, зав. каф. биологии и химии ФГБОУ ВО  
«УлГПУ им. И.Н. Ульянова» **О.Е. Беззубенкова**  
кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и химии  
ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» **В.А. Михеев**

**С47 Методы биологических исследований:** Методические указания по выполнению лабораторных работ и самостоятельной работы для бакалавров направления подготовки 06.03.01 Биология / С.М. Слесарев, Ю.В. Саенко. – Ульяновск: УлГУ, 2019. – 75 с.

Методические указания предназначены бакалаврам, выполняющим программу дисциплины «Методы биологических исследований». Методические указания включают в себя программу дисциплины, описание лабораторных работ, указания по выполнению индивидуальных заданий и самостоятельной работы, список литературных источников.

Методические указания предназначены для студентов, обучающихся по программе бакалавриата по направлению подготовки 06.03.01 Биология и преподавателей, осуществляющих ведение дисциплины «Методы биологических исследований».

**УДК 576**  
**ББК 28.070**

© Слесарев С.М., Саенко Ю.В., 2019  
© Ульяновский государственный университет, 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Цели и задачи освоения дисциплины.....	4
2. Требования к результатам освоения дисциплины .....	4
3. Содержание дисциплины.....	6
4. Вопросы для самостоятельной работы студентов в ходе подготовки к выполнению лабораторных работ.....	8
5. Лабораторные работы.....	11
6. Перечень вопросов к зачету.....	32
7. Тесты (тестовые задания) для текущего контроля и контроля самостоятельной работы обучающихся.....	66
8. Учебно-методическое и информационное .....	74
обеспечение дисциплины	

## 1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ:

**Цели освоения дисциплины:** обеспечить усвоение необходимого объема знаний, позволяющих студенту биологу получить глубокое представление об основных лабораторных методах исследования в биологии.

### Задачи освоения дисциплины:

- изучение специфики лабораторных методов исследования в биологии;
- развитие способности правильного определения методов экспериментального исследования согласно поставленной цели и задачам;
- практическое освоение методов исследования фиксированных клеток и тканей, методов лабораторной диагностики гельминтозов.
- обобщение и систематизация ранее полученных знаний о методах исследования в биологии;
- выработка умения и навыков практического использования полученных знаний при постановке собственного экспериментального исследования.

## 2. ТРЕБОВАНИЯ К РЕЗУЛЬТАТАМ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

№ п/п	Индекс компетенции	Содержание компетенции и (или ее части)	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесенных с индикаторами достижения компетенций		
			знать	уметь	владеть
1.	ОПК-2	способность использовать экологическую грамотность и базовые знания в области физики, химии, наук о Земле и биологии в жизненных ситуациях; прогнозировать последствия своей профессиональной деятельности, нести ответственность за свои	Методы исследования фиксированных клеток и тканей. Технологию изготовления гистологических препаратов. Методы исследования живых клеток и тканей. Методы исследования химического состава и метаболизма клеток и тканей. Количественные методы определения содержания различных веществ в клетках и тканях. Методы	Осуществлять правильный выбор методов исследования согласно поставленным целям и задачам. Прогнозировать результаты биологических процессов, протекающих в живых системах, опираясь на теоретические положения. Научно обосновывать наблюдаемые явления и взаимосвязи в организме. Работать с микропрепаратами и представлять	Навыками самостоятельной работы с учебной и справочной литературой, поиска необходимой информации. Навыками изготовления цито- и гистологических препаратов. Навыками микроскопирования и описания биологических объектов. Навыками анализа морфологических особенностей клеток, тканей, органов. Навыками безопасной

		решения	лабораторной диагностики гельминтозов. Методы анализа изображения клеточных и тканевых структур.	результаты наблюдений в виде схем, рисунков, описаний. Решать ситуационные задачи, опираясь на теоретические знания, законы и закономерности биологических и генетических процессов, происходящих в живых организмах. Проводить морфометрические исследования и измерения. Приобретать новые знания, используя современные информационные образовательные технологии.	работы в биологической лаборатории, обращения со световыми микроскопами, макро- и микропрепаратами, химической посудой, реактивами и электрическими приборами. Методами исследования фиксированных клеток и тканей. Методами сравнения структур организма и установления биологических особенностей специфики организации клеток, постклеточных структур, тканей, органов. Методами анализа изображения клеточных и тканевых структур.
2.	ПК-5	готовность использовать нормативные документы, определяющие организацию и технику безопасности работ, способность оценивать биобезопасность продуктов	нормативные документы, определяющие организацию научно-исследовательских лабораторий, технику безопасности работ, стандарты клинических лабораторных методов исследования.	Соблюдать технику безопасности на рабочем месте.	навыками работы с лабораторным и производственным оборудованием согласно требованиям техники безопасности; информационным и технологиями, позволяющими оценить биобезопасность материалов, применяемых в ходе работы.

		биотехнологических и биомедицинских производств			
--	--	---	--	--	--

### 3. СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

#### Раздел 1 Гистологическая техника

##### **Тема 1. Микроскопирование как основной метод изучения микрообъектов.**

Общие принципы световой микроскопии. Разновидности световой микроскопии. Организация рабочего места сотрудника лаборатории световой микроскопии.

Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Умерщвление лабораторных животных. Вскрытие лабораторных животных. Взятие и этикетирование материала. Приготовление отпечатков.

##### **Тема 2. Фиксация биологического материала.**

Общие принципы фиксации биологического материала. Правила фиксации. Фиксирующие средства и их применение. Простые фиксаторы: формалин, этиловый спирт, метанол, ацетон. Фиксирующие смеси: жидкость Мюллера, жидкость Ценкера, жидкость Максимова, жидкость Карнуа, фиксатор Бродского.

##### **Тема 3. Обезвоживание и пропитывание заливочными средами биологического материала.**

Промывание биологического материала. Обезвоживание биологического материала. Приготовление абсолютного спирта. Методика пропитывания парафином. Заливка в парафин. Пропитывание целлоидином. Заливка в целлоидин. Наклейка целлоидиновых блоков. Заливка в целлоидин-парафин. Заливка в желатин.

##### **Тема 4. Изготовление срезов.**

Микротомы и правила работы с ними. Уход за микротомом. Микротомные ножи. Правила резания на микротоме. Приготовление срезов из парафиновых блоков. Наклеивание срезов. Приготовление целлоидиновых срезов. Резание на замораживающем микротоме. Основные приемы работы с криостатом.

##### **Тема 5. Окрашивание и заключение срезов, мазков, отпечатков.**

Типы красителей и классификация способов окрашивания. Техника окрашивания: предварительная подготовка, проведение окрашивания, просветление и заключение срезов. Заключение в смолы. Заключение в водные среды. Приготовление растворов гематоксилина и эозина. Окрашивание гематоксилин-эозином.

## **Раздел 2. Морфологические методы исследования в биологии.**

### **Тема 6. Методы исследования фиксированных клеток и тканей**

Выбор методов исследования в зависимости от цели и поставленных задач.

**Тема 7. Выявление элементов нервной системы и сосудистого русла.** Техника импрегнации по методу Бильшовского-Грос и по методу В.В. Куприянова: приготовление рабочих растворов; обработка посуды; фиксация экспериментального материала; резание на замораживающем микротоме; техника импрегнации; интерпретация результатов окрашивания.

### **Тема 8. Выявление структурных элементов костной ткани.**

Особенности обработки и окрашивания костной ткани: фиксация и способы декальцинации костной ткани; промывание, обезвоживание и заливка гистологического материала; приготовление срезов из парафиновых блоков на санном микротоме; окрашивание и заключение срезов в смолы. Интерпретация результатов окрашивания.

### **Тема 9. Общий анализ крови. Морфология клеток крови.**

Техника приготовления мазка. Окраска мазка крови. Анализ содержания форменных элементов крови и их морфологическая характеристика в норме. Особенности лейкоцитарной формулы при различных патологических состояниях организма.

### **Тема 10. Методы исследования живых клеток и тканей.**

Прижизненные исследования клеток в организме. Витальное и суправитальное окрашивание. Исследование живых клеток и тканей в культуре. Понятие о клеточных гибридах и гибридомах. Технология рекомбинантных ДНК.

**Тема 11. Методы исследования химического состава и метаболизма клеток и тканей.**

Цито- и гистохимические методы. Метод радиоавтографии. Метод иммунофлюоресцентного анализа. Применение антител.

**Тема 12. Количественные методы определения содержания различных веществ в клетках и тканях.**

Понятие о цитоспектрофотометрии как методе 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. Понятие о интерферометрии.

### **Тема 13. Методы лабораторной диагностики гельминтозов.**

Общая характеристика методов лабораторной диагностики гельминтозов. Метод обогащения Фюллеборна. Метод Е.В. Калантарян. Количественные методы диагностики: овометрия, определение числа яиц гельминтов в капрологическом материале.

## **Тема 14. Методы анализа изображения клеточных и тканевых структур.**

Ручная морфометрия. Автоматические системы обработки и анализа изображений (на примере системы «Мекос – С1»).

### **4. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ В ХОДЕ ПОДГОТОВКИ К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ**

#### **Раздел 1 Гистологическая техника**

Лабораторная работа 1 Организация, оснащение и документация гистологической лаборатории.

Вопросы

1. Организация и оснащение гистологической лаборатории.
2. Правила техники безопасности гистолога.
3. Документация патоморфологической лаборатории

Занятие в гистологической лаборатории НИМБЦ УлГУ. Изучение целей, принципов организации и оснащения гистологической лаборатории, правил техники безопасности и санитарно-эпидемического режима при работе в лаборатории, правил оформления документации.

Лабораторная работа №2 Забор, вырезка и проводка материала для гистологического исследования

Вопросы

1. Забор материала на гистологическое исследование.
2. Методы приготовления гистологических препаратов.
3. Фиксация. Приготовление фиксаторов. Простые и сложные фиксаторы.
4. Приготовление забуференного 10% нейтрального формалина рН 7.2-7.4.
5. Промывание и обезвоживание материала. Приготовление гистологической батареи.
6. Техника удаления остатков спирта и ксилола (хлороформа, толуола) из исследуемого материала.

Лабораторная работа №3 Пропитывание и заливка материала в парафин

Вопросы

1. Пропитывание материала парафином
2. Заливка материала в парафин в заливочном центре или ручным способом.
3. Нарезание и наклеивание парафиновых блоков

Лабораторная работа 4 Микротом и работа с ним. Приготовление гистологических срезов. Метод замораживания тканей.

Вопросы

1. Микротомные ножи, подготовка их к работе
2. Типы микротомов: санный, ротационный, замораживающий.

3. Приготовление предметных стекол.
4. Приготовление гистологических срезов.
5. Показания к методу замораживания тканей. Работа с замораживающим микротомом и криостатом.

Лабораторная работа 5 Депарафинирование парафиновых срезов. Гистологическое окрашивание. Заключение срезов в оптически прозрачную среду.

Вопросы

1. Общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов.
2. Депарафинирование: цели и техника.
3. Базофилия и ацидофилия.
4. Окрашивание гематоксилин-эозином, специальные методы окрашивания.
5. Заключение срезов в оптически прозрачную среду.

Лабораторная работа 6 Проведение гистохимических исследований

Вопросы

1. Цель проведения и возможности гистохимических исследований. Механизм гистохимических реакций.
2. Гистохимическое выявление липидов, углеводов, железа, меди, кальция, нуклеиновых кислот, ферментов.

Лабораторная работа 7 Утилизация отработанного материала, дезинфекция использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

1. Цели и методы утилизации отработанного материала.
2. Цели и методы дезинфекции лабораторной посуды и инструментария.
3. Правила хранения фиксированных тканей, органов, блоков и микропрепаратов в архиве.

Лабораторная работа 8 Выявление элементов нервной системы и сосудистого русла.

Вопросы

1. Техника импрегнации по методу Бильшовского-Грос.
2. Техника импрегнации по методу В.В. Куприянова.
3. Выявление двигательных нервных окончаний в мышечной ткани методом импрегнации: подготовка оборудования и химических реактивов, взятие экспериментального материала и его фиксация; подготовка микротомом к приготовлению срезов; заточка микротомных ножей; изготовление срезов на замораживающем микротоме; приготовление красителя, окрашивание и заключение срезов в бальзам.

Лабораторная работа 9 Выявление структурных элементов костной ткани.

Вопросы

1. Особенности обработки и окрашивания костной ткани.

2. Фиксация и способы декальцинации костной ткани.
3. Промывание, обезвоживание и заливка гистологического материала в парафин.
4. Приготовление срезов из парафиновых блоков на санном микротоме.
5. Окрашивание и заключение срезов в смолы.
6. Интерпретация результатов окрашивания.

Лабораторная работа 10 Общий анализ крови. Морфология клеток крови.

Вопросы

1. Техника приготовления мазка.
2. Окраска мазка крови.
3. Анализ содержания форменных элементов крови и их морфологическая характеристика в норме.
4. Особенности лейкоцитарной формулы при различных патологических состояниях организма.

Лабораторная работа 11 Методы исследования живых клеток и тканей.

Вопросы

1. Прижизненные исследования клеток в организме.
2. Витальное и суправитальное окрашивание.
3. Исследование живых клеток и тканей в культуре.
4. Понятие о клеточных гибридах и гибридомах.
5. Технология создания рекомбинантных ДНК.

Лабораторная работа 12 Методы исследования химического состава и метаболизма клеток и тканей.

Вопросы

1. Цито- и гистохимические методы.
2. Метод радиоавтографии.
3. Метод иммунофлюоресцентного анализа.
4. Применение антител.

Лабораторная работа 13. Количественные методы определения содержания различных веществ в клетках и тканях.

Вопросы

1. Понятие о цитоспектрофотометрии как методе количественного изучения внутриклеточных веществ по их абсорбционным спектрам.
2. Цитоспектрофлуориметрия – метод количественного изучения внутриклеточных веществ по спектрам их флуоресценции или по интенсивности флуоресценции на одной заранее выбранной волне.
3. Понятие о интерферометрии.

Лабораторная работа 14. Методы лабораторной диагностики гельминтозов.

Вопросы

1. Общая характеристика методов лабораторной диагностики гельминтозов.

2. Метод обогащения Фюллеборна.

3. Метод Е.В. Калантарян.

4. Количественные методы диагностики: овометрия, определение числа яиц гельминтов в капрологическом материале.

5. Диагностика фасциолеза, тениоза, тениаринхоза, дикроцелиоза, лямблиоза, дефиллоботриоза, энтеробиоза, аскаридоза по данным капрологического анализа.

Лабораторная работа 15. Методы анализа изображения клеточных и тканевых структур.

Вопросы

1. Ручная морфометрия.

2. Автоматические системы обработки и анализа изображений (на примере системы «Мекос – С1»).

3. Подготовка микроскопа к работе.

4. Принадлежности для измерения и счета.

5. Морфометрические исследования экспериментального материала.

6. Методы статистической обработки результатов исследования.

## **5.ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ**

**5.1. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1. Организация, оснащение и документация гистологической лаборатории.**

### **ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОЧЕГО МЕСТА**

Организация рабочего места во многом определяет эффективность и качество работы. Рациональная расстановка и размещение лабораторной посуды, инструментария, необходимых растворов и реактивов позволяют без суеты, с наименьшей затратой усилий выполнить за одно и то же время больший объем работы.

В *рабочей комнате* должны быть вытяжной шкаф, химический и физический столы, шкаф и сейф для хранения химических реактивов. Лабораторная мебель, выполненная из древесины, малопригодна для работы с многими токсичными веществами, поскольку затруднена ее последующая санитарная обработка, поэтому предпочтение следует отдать специальной лабораторной мебели из металла, пластика, которая снабжена выдвижными частями, подводкой воды, вакуума, воздуха и газа. Рабочий стул должен иметь регулируемую высоту сиденья и спинки и легко перемещаться по полу.

Перечень необходимого оборудования лаборатории включает технические и аналитические весы, рН-метр, микротомы (санные, ротационные, замораживающие), криостат или криокит, водяную баню, столик для расплавления парафиновых срезов, комплекты автоматических пипеток, термостаты, холодильники, микроскопы, автоматы для проводки материала и др.

*Рабочий стол.* При отсутствии специальных столов для лаборанта с успехом может быть приспособлен любой стол (желательно с ящиками) с площадью рабочей поверхности не менее 60 x 120 см.

Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из какого-либо влагоустойчивого материала (настольное или толстое оконное стекло, линолеум, пластик или клеенка). Однако участок стола, предназначенный для непосредственной работы по приготовлению препаратов, в любом случае необходимо накрыть стеклом и расположить под ним листы белой или черной бумаги. Этим создается соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными (белый лист) и неокрашенными (черный лист) объектами. Рекомендуется также на оба листа нанести контуры предметного стекла с обозначением места расположения и размеров покровного стекла. Этот простой прием позволяет рационально разместить на предметном стекле срезы в процессе их заключения.

Для того чтобы удобнее расположить необходимое оборудование, следует иметь *двухъярусную полку* для реактивов, растворов и посуды, которая устанавливается либо перед работающим (вдоль заднего края стола), либо сбоку в зависимости от расположения стола по отношению к источнику дневного света.

Достаточная *освещенность* рабочего места является одним из важнейших условий, так как изготовление препаратов требует значительного напряжения зрения. Необходимо максимально использовать дневной свет. Лучше ставить рабочий стол около окна. Однако даже при достаточном свете рабочее место должно быть оснащено специальным осветителем к микроскопу или настольной лампой (с наклоняющейся верхней частью) для обеспечения постоянной освещенности препаратов при микроскопировании, так как изменение освещенности неблагоприятно сказывается на восприятии цвета препарата и затрудняет оценку качества его окраски.

## ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА

В любой гистологической лаборатории применяют большой набор разнообразной лабораторной посуды.

*Широкогорлые банки* с притертыми пробками различной вместимости — от 50 до 200 мл — используют для составления гистологических батарей, предназначенных для подготовки кусочков тканей к заливке различными средами. Более крупные банки применяют для фиксации и хранения кусочков тканей в фиксирующих жидкостях, обработки предметных стекол, приготовления нейтрального формалина и пр. Перед помещением в банки легко испаряющихся жидкостей (спирт, эфир, ацетон и т.д.) необходимо

тщательно проверить, хорошо ли притерты пробки. Для этого достаточно проделать пробу с эфиром: если пробка хорошо притерта, то налитый в банку эфир не определяется по запаху.

*Бюксы* — небольшие круглые стеклянные стаканчики различного диаметра и высоты с шлифованными крышками — наиболее распространенная посуда для обработки гистологических срезов и маленьких кусочков тканей.

*Биологические стаканчики* — круглые, овальные или четырехугольные (как и высокие бюксы) — применяют для проводки гистологических срезов, монтированных на предметных стеклах. Для придания стаканчикам большей устойчивости и обеспечения определенного порядка в расстановке их помещают в специальные стойки, изготовленные из дерева или пластмассы, по несколько штук в ряд в зависимости от методики обработки.

*Кюветы* — четырехугольные стеклянные чашки с крышками, имеющие на двух противоположных сторонах прорези, в которые вставляют предметные стекла. Применяют для одновременной окраски нескольких срезов, наклеенных на предметные стекла.

*Чашки Петри* — широкие, плоские стеклянные чашки с крышками — пригодны для различных манипуляций (окраска свободно плавающих и наклеенных на предметные стекла срезов, использование в качестве подставок под бюксы и т.д.).

*Мерная посуда* — цилиндры и мензурки различной емкости (от 10 до 250—500 мл), воронки разных размеров.

*Химические стаканчики* — круглые стеклянные стаканчики без крышек вместимостью 50—100 мл — находят широкое применение при проведении гистохимических реакций, окраски срезов, наклеенных на стекла и т. д.

*Колбы (плоскодонные)* вместимостью от 50 мл до 2л. Малые колбы применяют для приготовления и хранения растворов различных красителей, большие — под дистиллированную воду и прочие жидкости, расходуемые в больших количествах.

*Кристаллизаторы* — круглые глубокие чашки из толстого стекла (различной вместимости) — применяют для массовой промывки наклеенных на стекла срезов, сливания отработанных жидкостей и других надобностей.

*Пипетки* обычные (предназначенные для закапывания лекарств) используют для накалывания на срезы красителей и различных жидкостей, градуированные (вместимостью 0,1—100 мл) применяют для отмеривания малых количеств различных жидкостей при составлении растворов (особенно в гистохимической практике).

*Часовые стекла* (различного диаметра) применяют для обработки свободно плавающих срезов, нуждающихся в контроле под микроскопом (серебрение нервной ткани и др.).

Правильная расстановка и этикетировка лабораторной посуды играют существенную роль, так как позволяют избежать лишних движений и

путаницы в процессе обработки препаратов, стандартизируют рабочий процесс и в конечном итоге повышают производительность труда. Прежде чем приступить к какому-либо этапу приготовления препаратов (обезвоживание, окраска и т.д.), следует отобрать необходимую чистую посуду, обозначить ее назначение и целесообразно расположить.

Особое внимание следует уделять своевременной этикетировке посуды.

Помимо лабораторной посуды, для приготовления микропрепаратов необходимы предметные и покровные стекла.

*Предметные стекла* — прямоугольные пластины размером 76 X 26 мм и толщиной 1—2 мм, предназначенные для размещения микрообъектов в процессе приготовления постоянных препаратов.

*Покровные стекла* представляют собой тонкие (0,15—0,2мм толщины) пластинки различных размеров. Служат для покрытия объектов, расположенных на предметном стекле.

Чистота посуды является одним из важнейших условий. Поэтому всю посуду, идущую в употребление, предварительно тщательно моют в теплой мыльной воде специальными щетками, затем в холодной проточной воде и в заключение ополаскивают дистиллированной. В тех случаях, когда посуда должна быть особенно чистой (приготовление растворов, проведение гистохимических реакций), ее помещают в смесь следующего состава:

Бихромат калия —  $K_2 Cr_2 O_7$  (насыщенный раствор) - 100 мл

Вода горячая - 1000 мл

Серная кислота (концентрированный раствор) - 100 мл

Для приготовления этой смеси сначала растворяют в горячей воде бихромат калия, затем раствор охлаждают и только после этого добавляют серную кислоту тонкой струйкой. В этом составе предметные стекла (и любую другую посуду) выдерживают 2—3 дня, а затем промывают в проточной воде в течение 1—2 дней. Приготовление раствора требует соблюдения техники безопасности: работа в резиновых перчатках и обязательно в вытяжном шкафу. При этом особое внимание следует обратить на то, чтобы добавлять не водный раствор к серной кислоте, что может привести к разбрызгиванию кислоты и ожогам, а кислоту к водному раствору. Хранить раствор с помещенными в него стеклами также рекомендуется в вытяжном шкафу.

Вымытую лабораторную посуду не вытирают, а помещают для сушки в сушильный шкаф, так как при вытирании на ней могут остаться волокна от ткани.

Предметные стекла подсушивают на воздухе (или в сушильном шкафу), закладывают в широкогорлую стеклянную банку и, залив смесью из равных частей спирта и эфира (или бензола), плотно закрывают.

Такая обработка не только очищает стекла от грязи, но и обезжиривает их поверхность, что очень важно для хорошего приклеивания срезов. Перед употреблением стекло достают пинцетом и вытирают чистой (желательно льняной) тряпкой, следя при этом, чтобы на поверхности не оставались

волоконца от материи и пылинки. Держать стекло нужно за края, чтобы не оставлять на поверхности следов пальцев.

Подобным же образом подготавливают покровные стекла, помещая их после промывания в бюксы со спирт-эфиром. Протирка покровных стекол из-за их тонкости требует большой осторожности и соответствующих навыков.

Следует принять за правило — не оставлять использованную посуду длительное время без промывания. Если нет возможности ее тут же окончательно вымыть, то необходимо ополоснуть и залить водой. Для удаления засохших реактивов требуется значительно больше усилий, а иногда их вовсе невозможно отмыть.

## ИНСТРУМЕНТЫ

В повседневной работе необходимо иметь набор инструментов: ножницы с прямыми браншами, средние и малые (глазные); пинцеты разных размеров и образцов: анатомические (концы браншей плоские с насечками), хирургические (концы с выступами), специальные (с тонкими изогнутыми концами); скальпели средние и малые (глазные), препаровальные иглы тонкие прямые или изогнутые с ручкой (применяются для накалывания объектов при фиксации, расправления свернувшихся срезов, переноса их из одной чашечки в другую и т.д.); стеклянные крючки для вылавливания и переноса срезов; кровоостанавливающие зажимы для пережимания сосудов и захвата тканей при вскрытии животных; корнцанг—зажим с длинными ручками — для извлечения предметных стекол из банок со спирт-эфиром, а также для захвата мелких лабораторных животных; шпатели — металлические или пластмассовые прямые и изогнутые лопаточки для переноса срезов и кусочков тканей, взятия различных сыпучих веществ; шприцы различной вместимости для инъекций красителей при прижизненной окраске тканей и других процедур.

За инструментом необходим тщательный уход. После применения его следует сразу же мыть (если нужно, очищать) и насухо вытирать (или высушивать в сушильном шкафу).

Хранить инструменты следует в определенном месте. Это облегчает их нахождение и экономит рабочее время.

Необходимо также иметь спиртовку, небольшую мягкую волосяную кисточку (для снятия срезов с микротомного ножа), иголку, нитки и плотную бумагу для этикетировки материала, карандаши для письма по стеклу, фильтровальную и индикаторную (для определения рН раствора) бумагу. Для вырезания кусочков из органов необходимы также лезвия безопасной бритвы и доска, пластиковая или деревянная, размером 40x25 см.

Необходимо иметь несколько тетрадей для записей. Основная тетрадь служит для записей освоенных и осваиваемых методик обработки материала, ибо, несмотря на наличие методических руководств, у каждого в процессе работы появляются свои наблюдения, вызывающие порой дополнения или некоторые видоизменения отдельных этапов обработки.

У лаборантов, работающих с экспериментальным материалом, должна быть тетрадь (вернее, книга), в которую записывают протокол эксперимента (вид и порядковый номер животного, дата и характер эксперимента, дневник наблюдений, дата умерщвления, какой материал взят для исследования и в какие фиксаторы помещен). Единой формы протокольной тетради нет.

## **5.2. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2. Забор, вырезка и проводка материала для гистологического исследования.**

Сбор материала является первым этапом в приготовлении гистологических препаратов, и от того, насколько правильно выполнена эта процедура, зависит успех всей работы.

Существует несколько путей получения материала:

- 1) от животных, умерщвленных специально для этих целей;
- 2) от животных и людей в результате прижизненного оперативного иссечения кусочков тканей из органов живого организма (биопсия);
- 3) взятие материала от трупа.

Там, где возможно, следует предпочесть первые два способа, так как они позволяют приготовить препараты, наиболее полно отражающие прижизненное состояние микроструктур.

### Умерщвление экспериментальных животных

В лабораторной практике применяют ряд методов умерщвления экспериментальных животных:

1. отсечение головы (декапитация),
2. умерщвление при помощи наркоза,
3. пропускание электрического тока через тело животного,
4. введение в кровеносное русло воздуха (уколом в сердце или внутривенно) или в плевральную полость эфира (хлороформа).

Выбор метода диктуется видом животного и целями исследования, но наибольшее распространение в лабораторной практике получили первые два способа умерщвления.

Отсечение головы (декапитация) является основным способом умерщвления мелких лабораторных животных (лягушки, мыши, крысы) и осуществляется с помощью ножниц. Для декапитации более крупных лабораторных животных (морские свинки, кролики, кошки, собаки) применяют специальные станки. Умерщвление при помощи наркоза проводят с использованием эфира или хлороформа. Для этого животное помещают в эксикатор, на дно которого кладут смоченный в наркотическом веществе тампон. Крышку эксикатора желателно промазать глицерином или вазелином, чтобы не было испарения хлороформа, а работу следует проводить под вытяжкой.

### Вскрытие лабораторных животных

После умерщвления тело животного быстро фиксируют в положении на спине. Лягушек, тритонов, мышей и других мелких лабораторных животных

фиксируют на дощечках, восковых или пробковых пластинках (рис. 1), прикалывая за растянутые в стороны лапки. Для фиксации средних и крупных лабораторных животных используют специальные станки или же изготовленные для этих целей доски (оцинкованные или окрашенные с вбитыми по краям крючками или гвоздиками для привязывания конечностей).

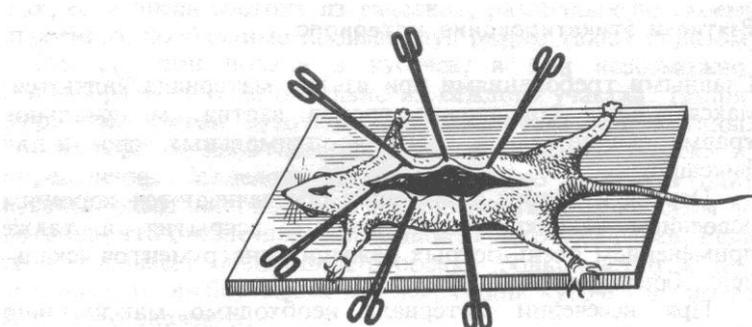


Рис. 56.  
Вскрытие лабораторного животного.

Техника вскрытия брюшной и грудной полостей для всех лабораторных животных одинакова. Однако у животных, имеющих шерстный покров, вначале следует иссечь достаточно широкий кожный лоскут, чтобы избежать загрязнения внутренних органов: Для этого, захватив и приподняв (с помощью хирургического пинцета) кожу нижней части стенки живота по средней линии, подрезают ножницами образовавшуюся складку по направлению к голове, срезая кожный лоскут на нужном протяжении.

Затем следует сменить ножницы (или очистить их от прилипшей шерсти) и удалить влажным тампоном шерсть, попавшую на образовавшуюся «дорожку».

Вскрытие брюшной полости. Нижнюю часть стенки живота приподнимают пинцетом по средней линии (чтобы не повредить органы), прорезают ножницами вход в брюшную полость, вводят туда одну из branшей (но обязательно тупую) и разрезают стенку сверху до грудины. Затем берут кровоостанавливающие зажимы, захватывают ими внутренние слои стенки живота вместе с брюшиной и отворачивают кнаружи, раскрывая брюшную полость.

Вскрытие грудной полости. Вскрытие производят двумя разрезами через реберные хрящи по обе стороны от грудины снизу вверх. Образовавшийся костно-хрящевой лоскут удаляют.

У мелких лабораторных животных следует вскрыть одновременно брюшную и грудную полости для обеспечения достаточно свободного доступа к внутренним органам, у крупных же вскрывать только ту полость, откуда необходимо брать органы для исследования.

#### Взятие и этикетирование материала

Главными требованиями при взятии материала являются:

1. максимальное сокращение сроков взятия,
2. минимальное травмирование тканей,

### 3. создание оптимальных условий для фиксации.

При иссечении материала необходимо максимально бережно обращаться с тканями: участки органа, подвергшиеся травмированию (например, при зажиме пинцетом), не следует оставлять для исследования.

Инструмент для вскрытия и, особенно, для взятия материала необходимо хранить отдельно, своевременно затачивать и не применять для других целей.

Благоприятные условия для фиксации создаются правильным выбором размера фиксируемого материала, ибо необходимо обеспечить равномерное и сравнительно быстрое проникновение фиксирующей жидкости во всю его толщину. Поэтому нужно вырезать кусочки толщиной не более 5—10 мм. Поперечный же и продольный размеры не имеют столь важного значения и определяются задачами исследования.

Следует помнить, что предупреждение исследуемого материала от высыхания является одним из важнейших условий. Поэтому производить умерщвление и вскрытие животных следует лишь после того, как подготовлено все необходимое для быстрой фиксации. Если подсыхание все же возможно, то исследуемый материал необходимо смачивать изотоническим раствором хлорида натрия, смачивание водой категорически воспрещается, так как в силу разности осмотического давления вода проникает в ткани и вызывает разрушение микроструктур.

Особые приемы требуются для взятия материала, имеющего строение пленок, и из полых мышечных органов, выстланных слизистой оболочкой, так как пленки в фиксирующей жидкости сморщиваются, а стенка полого органа после разрезания вследствие сокращения мышечной оболочки изгибается дугообразно слизистой оболочкой наружу (кишечник, пищевод, желудок, мочевой пузырь и т. д.). Поэтому, прежде чем брать такой материал, необходимо ванночку или стеклянную чашку с плоским дном залить расплавленным воском так, чтобы толщина покрытия равнялась 1,5—2 см, и дать ему остыть. Следует также приготовить иглы для накалывания (металлические из нержавеющей стали, стеклянные или растительные), фиксирующие жидкости и лишь после этого приступить к взятию материала.

Вместо восковых подушек для накалывания препаратов можно применять пробковые пластинки.

Если необходимо приготовить гистологический препарат из стенки кишечника, иссекают нужный отрезок органа, ополаскивают его в изотоническом растворе хлорида натрия (чтобы не высохла серозная оболочка), разрезают вдоль (напротив брыжейки) и накалывают с помощью игл на восковую или пробковую подушку в расправленном состоянии слизистой оболочкой кверху. При расправлении нужно следить, чтобы не перерастянуть взятый кусочек, так как это приведет к искажению истинного взаимоотношения слоев и деформации тканей. Затем в чашку с воском наливают фиксирующую жидкость таким образом, чтобы струя не попадала на слизистую оболочку и чтобы весь материал был покрыт полностью. При накалывании на пробку ее опускают в сосуд с фиксирующей жидкостью вниз стороной, к которой прикреплен объект.

После 1/2 — 2ч пребывания в фиксирующей жидкости обрабатываемый материал освобождают от игл, вырезают кусочек, выбрав нужный участок, и помещают в сосуд с фиксатором для продолжения фиксации.

Применяют и другой способ фиксации небольших полых органов — без разрезания их стенок. Для этого нужный отрезок органа перевязывают с одного конца, заполняют фиксирующей жидкостью и, перевязав противоположный конец, помещают в сосуд с фиксатором. Этим достигается более быстрое проникновение фиксирующей смеси в ткани органа (одновременно с двух сторон) и сохранение естественной формы органа.

Для того чтобы легче было ориентировать кусочки полых органов в продольно-поперечном направлении при заливке и приготовлении микропрепаратов, необходимо взять за правило вырезать их таким образом, чтобы стороны имели различную длину и чтобы при этом длинная сторона кусочка соответствовала длинной оси органа.

Взятие материала из легкого также имеет некоторые особенности, ибо легкое всегда содержит воздух и ткань его плавает, не погружаясь полностью в фиксирующую жидкость. Для полного погружения необходимо кусочек органа завернуть в марлю вместе с каким-либо грузом (стекло, фарфор, нержавеющий металл), а если нужно фиксировать долю или все легкое, то груз привязать к трахее или бронху.

При взятии материала из кости необходимо выпиливать кусочки мелкозубчатой пилой (костной или лобзиком). Это позволяет сохранить архитектуру исследуемой костной ткани.

Помимо гистологических препаратов в виде срезов, полученных с кусочков органов, следует упомянуть о мазках и отпечатках. Первые находят широкое применение при исследованиях костного мозга и периферической крови, вторые — паренхиматозных органов и эпителиальных покровов слизистых оболочек.

Общим и обязательным условием для приготовления таких препаратов является наличие тщательно вымытых и обезжиренных предметных стекол, а для мазков еще и стекол с отшлифованными поперечными ребрами.

Приготовление отпечатков: вырезают из исследуемого органа (селезенка, печень, лимфатический узел) небольшой кусочек, один из краев которого срезают лезвием так, чтобы поверхность его была как можно ровнее. Поскольку отпечаток должен быть достаточно тонок, необходимо сначала сделать несколько отпечатков на фильтровальной бумаге, а затем аккуратно произвести отпечатки органа на тщательно обезжиренном, чистом предметном стекле; для этого достаточно лишь легкого нажатия кусочком органа на поверхность стекла.

Приготовленные мазки и отпечатки подсушивают при комнатной температуре, после чего фиксируют и окрашивают по избранной методике.

Укажем лишь на некоторую особенность взятия материала из патологически измененных органов животных и человека.

Вырезать кусочек следует таким образом, чтобы в него попала зона перехода очага поражения в нормальный участок (рис. 58), с прилежащими

территориями здоровой и измененной ткани, необходимо также взять отдельные кусочки из обоих участков.

Для того чтобы точно знать, какой материал взят для фиксации, от какого животного, из какого органа и когда, необходимо сразу же произвести его этикетировку. Наиболее распространенный способ — прошивание кусочков ниткой, на конце которой прикрепляется маленькая бирка из картона или плотной бумаги с обозначением простым карандашом номера животного (соответствующего протокольной тетради), даты взятия, названия органа, а также схемы ориентации кусочка. Если кусочек или орган не могут быть прошиты, то их перед погружением следует завернуть в марлю и перевязать ниткой, снабженной на конце этикеткой. Надпись на бирке необходимо делать только простым карандашом во избежание размывания при помещении в раствор.

### **Задачи и правила фиксации**

Основная задача фиксации предупредить необратимые посмертные изменения в тканях. Это достигается путем фиксации взятого для исследования материала.

Фиксация, как указывает сам термин, представляет собой закрепление, сохранение в обрабатываемом кусочке органа того строения, которое он имел при жизни. В основе действия фиксаторов лежат физико-химические процессы и, в первую очередь процесс коагуляции белков.

Фиксирующая жидкость должна отвечать двум основным требованиям:

- 1) достаточно быстро проникать в ткани и
- 2) действовать «мягко», не вызывая грубых нарушений тканевых структур (сморщивание, чрезмерное уплотнение и т.п.).

Т.к. орган состоит из нескольких видов тканей, то не существует универсального фиксатора, который бы сохранял одинаково хорошо все составные части клеток и тканей. Одна и та же фиксирующая жидкость может дать совершенно противоположный результат (так, спирт хорошо фиксирует гликоген, но зато полностью растворяет жиры).

Большинство фиксаторов оказывает уплотняющее действие на обрабатываемый материал. Для многих гистологических методов хороша формалиновая фиксация. Однако при тонких цитологических и гистохимических исследованиях фиксация в формалине непригодна. Так, при цитологических исследованиях употребляются сложные фиксаторы, в состав которых наряду с формалином входят осмиевая кислота или соли тяжелых металлов (кобальт, уран, кадмий, хром, ртуть и т.д.) Для гистохимических же исследований предпочтительней брать смеси на спиртовой основе. При некоторых исследованиях необходимо пользоваться несколькими фиксирующими жидкостями.

Для того чтобы успешно осуществить процесс фиксации, необходимо придерживаться определенных **правил**.

1. Размер исследуемых кусочков должен быть таким, чтобы произошло полное его пропитывание в оптимальные для данного фиксатора сроки. Решающее значение при этом имеет диффузионная способность фиксирующих жидкостей, которая у разных фиксаторов далеко не одинакова. Например, низкой диффузионной способностью обладают осмий, пикриновая кислота, платина, высокой — формалин, трихлоруксусная и уксусная кислоты, метиловый спирт и др. При фиксации ткани печени 1 % осмиевой кислотой в течение 4ч последняя проникает на глубину лишь 0,5—1 мм, в то время как концентрированный формалин за это же время успевает проникнуть на 4—5 мм. Следовательно, для фиксации осмием надо брать более тонкие кусочки (3—5 мм), чем для обработки формалином (10—15 мм). В среднем же для большинства фиксаторов берут кусочки толщиной 5—10мм.

2. Количество фиксирующей жидкости должно не менее чем в 20 раз превышать объем исследуемого материала, иначе ее будет недостаточно для осуществления процесса фиксации, а вода, входящая в состав тканей, может изменить свойства фиксатора.

3. Фиксируемый объект нужно помещать так, чтобы обеспечить одновременно его пропитывание со всех сторон. Для этого кусочки кладут на стеклянную или обычную вату, помещенную на дно сосуда, или подвешивают, прошив ниткой (или завернув в марлю). Очень мелкие объекты, которые трудно брать пинцетом и можно повредить при переносе из одного сосуда в другой (тканевые культуры и др.), следует поместить в тонкую стеклянную трубку и, завязав ее нижний конец марлей, пропустить через пробку, закрывающую сосуд с фиксатором. В такой «упаковке» объект переносят через все необходимые среды.

4. Необходимо строго соблюдать время фиксации, которое определяется свойствами жидкости, исследуемого материала и толщиной взятого кусочка.

5. Фиксацию можно считать законченной после того, как жидкость полностью пропитала фиксируемый объект. Равномерная окраска и одинаковая консистенция тканей на поверхности разреза свидетельствуют о том, что процесс фиксации завершен.

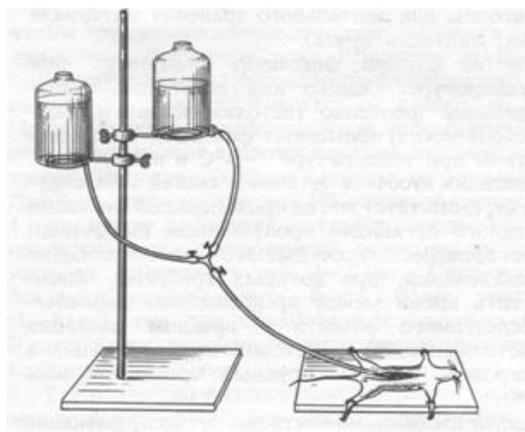
Следует помнить, что излишнее пребывание объекта в фиксирующих жидкостях отрицательно сказывается на качестве получаемых препаратов, ибо ткани становятся хрупкими, ухудшается их окрашиваемость, наступает сжатие или набухание и т.д. Лишь некоторые фиксаторы пригодны для длительного хранения материала (10% формалин, жидкость Буэна).

В большинстве случаев фиксацию производят при комнатной температуре. Однако для некоторых специальных исследований (особенно гистохимических и электронно-микроскопических) применяют фиксацию охлажденными жидкостями при температуре +4°C и ниже.

Помимо фиксации кусочков органов и тканей в фиксирующих жидкостях, существует метод прижизненной фиксации органов или целого организма пропусканием (**перфузией**) **фиксатора** через кровеносные сосуды. Этот способ особенно ценен для исследований, при которых требуется максимально сократить время между прекращением жизнедеятельности

исследуемого объекта и началом фиксации (некоторые гистохимические и гистологические методы), а также зафиксировать целиком крупный орган или весь организм.

Для этих целей необходимо взять две бутылки, имеющие выпускные приспособления внизу (емкость сосудов подбирается в зависимости от размеров объекта). На отводные стеклянные трубочки, выступающие из нижних пробок, надевают резиновые трубки, которые натягивают на ответвления тройника. Желательно, чтобы ветви тройника имели краны; если же их нет, то нужно приспособить зажимы к трубкам. На оставшуюся свободной (отводящую) ветвь тройника также надевают резиновую трубку, соединенную со стеклянной канюлей (размер канюли подбирают в зависимости от диаметра сосуда). Одну из бутылей наполняют изотоническим раствором хлорида натрия, другую — фиксирующей жидкостью. Обе бутылки закрепляют в штативе на высоте, достаточной для обеспечения нужного давления жидкости. В случае надобности бутылки можно снабдить манометром и грушей для нагнетания воздуха. Когда система подготовлена, ее заполняют, обращая особое внимание на то, чтобы нигде не было пузырьков воздуха, так как они могут закупорить сосуд и нарушить прохождение фиксатора. Лишь по окончании всей подготовительной работы животному дают наркоз, привязывают к станку и обнажают оперативным путем артерию и вену подлежащего фиксации органа. Артерию берут на две шелковые нити, приподнимают, надрезают стенку маленькими остроконечными кривыми ножницами и вводят канюлю по ходу кровотока. Закрепив ее с помощью одной из нитей, вскрывают вену и, открыв кран, начинают пропускать изотонический раствор хлорида натрия (периферический конец артерии перевязывают оставшейся второй ниткой). Как только из вены вместо крови появится светло-розовая жидкость, введение изотонического раствора хлорида натрия прекращают и начинают вводить фиксирующую жидкость до тех пор, пока она не начнет вытекать из вены. После этого перевязывают вену и, когда ток жидкости из бутылки прекратится, перевязывают артерию. Затем извлекают орган и кладут в фиксирующую жидкость. Если нужно фиксировать животное целиком, то наливку производят через аорту или левый желудочек сердца.



Раннее переключение приводит к фиксации сосудов, заполненных кровью, что служит препятствием к дальнейшему прохождению фиксатора, позднее вызовет нарушение проницаемости сосудистых стенок и отек тканей.

### Фиксирующие средства и их применение

Применяемые фиксаторы разделяют на две основные группы:

- 1) фиксирующие вещества (простые фиксаторы);
- 2) фиксирующие смеси (сложные фиксаторы).

### Простые фиксаторы

**Формалин (формол).** Формалин является самым дешевым и распространенным фиксатором. В чистом виде представляет светлую, сильно пахнущую жидкость, состоящую из 40% водного раствора формальдегида. Применяют преимущественно в виде 10% водного раствора, для чего 1 часть формалина (т.е. 40% раствора формальдегида) разводят 9 частями воды. Приготавливают раствор обязательно на водопроводной воде, так как дистиллированная вызывает набухание тканей. Широкое применение формалин получил благодаря ряду свойств:

- а) высокой степени диффузии;
- б) способности хорошо сохранять форму, окраску и структуру исследуемого объекта;
- в) оказывать длительное фиксирующее действие (до нескольких лет), существенно не ухудшая при этом качество материала;
- г) хорошо сохранять жиры и липоиды.

Высокая диффузионная способность и незначительное осаждающее действие позволяют формалину довольно быстро и глубоко проникать в ткани, что позволяет фиксировать кусочки органа размером от 1 см и более, а при необходимости и довольно крупные органы целиком.

Срок фиксации тканей в формалине 24—48 ч. Обычный формалин, как правило, содержит примесь метилового спирта и муравьиной кислоты, количество которой увеличивается под влиянием света.

При охлаждении формалина в растворе появляется муть, оседающая в виде белого осадка (параформальдегид). Такой же осадок наблюдается на стенках сосуда и при испарении формалина. Поэтому формалин следует хранить в темной плотно закрывающейся стеклянной посуде при температуре не ниже 9°C.

Нейтрализация формалина. Примесь в формалине муравьиной кислоты придает раствору слабокислый характер, что нежелательно при применении ряда методов исследования (некоторые гистохимические реакции, серебрение раствором нитрата серебра). Способ нейтрализации формалина довольно прост: в сосуд засыпают карбонат кальция (или карбонат магния) в таком количестве, чтобы на дне образовался слой толщиной 1,5—2 см. Затем наливают формалин, несколько раз энергично встряхивают и оставляют стоять 24—48 ч. В течение этого времени происходит нейтрализация раствора.

Побочные действия формалина. Длительное хранение препаратов в концентрированном растворе формалина придает тканям чрезмерную плотность, затрудняющую дальнейшую обработку и ухудшающую качество препарата. Устранить этот недостаток можно путем помещения материала на 2 нед в 1% раствор нитрата серебра или 10% раствор лимонной кислоты. Длительное хранение в 10% растворе формалина приводит также к набуханию объекта, что необходимо помнить при его измерении после фиксации.

При фиксации формалином в препаратах нередко появляется темно-коричневый кристаллический осадок — результат взаимодействия формалина с находящимся в тканях гемоглобином. Его удаляют путем помещения неокрашенных срезов в 1—5% раствор аммиака или 70% этиловый алкоголь на различные сроки (от 5 мин до 4ч). Затем препарат тщательно промывают и ведут дальнейшую обработку.

Следует постоянно помнить, что длительное действие паров формалина сильно раздражает слизистые оболочки. Смачивание кожи формалином оказывает дубящий эффект, а при повторных частых контактах вызывает сухую экзему. Поэтому перед препарированием формалиновые препараты помещают в слабоаммиачную воду (для устранения запаха) и работают в резиновых перчатках (при возможности под вытяжным устройством).

**Этиловый спирт.** Фиксирующее действие осуществляется за счет отнятия у тканей воды и коагуляции белков. Несмотря на ряд отрицательных свойств спирта (сморщивание клеток в результате быстрого отнятия воды, растворение и экстракция жиров и гемоглобина), он как фиксатор находит широкое применение в микроскопической технике. Это объясняется тем, что этиловый спирт осуществляет быструю фиксацию, не требующую обезвоживания тканей перед заливкой в парафин и целлоидин. Будучи химически неактивным веществом, спирт особенно пригоден при гистохимических исследованиях. *В нем хорошо сохраняются такие вещества, как муцины, гликоген, мочевая кислота, железо, кальций,* которые легко растворимы в других фиксирующих жидкостях.

Чаще применяют 96% и абсолютный этиловый спирт. Некоторые авторы рекомендуют также концентрации 80 и 90%. Время фиксации зависит от материала: для тонких пленок — 15—30 мин, для кусочков толщиной 3—4 мм — 2—4 ч. В связи с тем, что спирт легче воды, она, экстрагируясь из тканей, опускается на дно. Поэтому под кусочки исследуемого материала нужно обязательно подкладывать толстый слой ваты. Излишнее пребывание препарата в спирте вызывает чрезмерное уплотнение ткани, что плохо отражается на последующей ее обработке.

**Метиловый спирт (метанол).** Бесцветная жидкость, в чистом виде напоминает по запаху этиловый спирт, технический же (неочищенный) метанол обладает неприятным запахом, обусловленным примесью других веществ. В микроскопической технике применяют в виде абсолютного, лишенного примесей спирта для фиксации мазков крови. Лучше всего пользоваться метанолом, предназначенным для анализа.

Следует помнить, что метанол является сильным ядом, поэтому требуется соблюдение правил употребления и хранения, предусмотренных для ядовитых веществ группы А.

**Ацетон.** В последнее время все большее применение в гистологических лабораториях для гистохимических целей находит фиксация ацетоном благодаря простоте, возможности быстрой фиксации и сохранению после нее многих химических соединений, в том числе *активности многих ферментов*. Недостаток метода — нарушение тонкой цитологической структуры. Применять следует бесцветный (безводный) раствор. Фиксировать можно как кусочки тканей, так и срезы. Приготовленные в криостате срезы расправляют кисточкой на предметном стекле, переносят в плотно закрытый стаканчик с холодным (5—10%) ацетоном и помещают в баню с сухим льдом или же в камеру криостата. Срок фиксации зависит от толщины срезов (в среднем 5—10 мин можно хранить и несколько дней).

Из других фиксирующих средств следует упомянуть дихлорид ртути (сулема), соли тяжелых металлов (кобальт, платина, уран и т.д.) и кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, осмиевая, хромовая и др.). В чистом виде эти вещества применяют редко, но зато они являются составной частью многих фиксирующих смесей.

#### Фиксирующие смеси (сложные фиксаторы) и их применение

**Жидкость Мюллера.** В настоящее время применение ее в чистом виде ограничено. Однако она служит исходным раствором для приготовления таких распространенных фиксаторов, как жидкости Ценкера, Орта, Максимова и др. Состав:

Бихромат калия 2,5 г  
Сульфат натрия 1 г  
Вода дистиллированная 100 мл

Для лучшего растворения бихромата калия рекомендуется подогреть воду.

**Жидкость Ценкера** (сулемовая смесь). Один из лучших фиксаторов для приготовления обзорных препаратов и препаратов для ряда тонких гистологических исследований. Обеспечивает хорошую окрашиваемость тканей. Состав и способ употребления:

Жидкость Мюллера 100 мл  
Дихлорид ртути ( $\text{HgCl}_2$ ) 5 г  
Уксусная кислота ледяная 5 мл

(прибавляется непосредственно перед употреблением; может быть заменена равным количеством формалина по Гелли).

Толщина фиксируемых кусочков не должна превышать 5 мм. Время фиксации 1—24 ч в зависимости от толщины и свойств объекта.

Последующая обработка. После тщательного промывания в проточной воде в течение 20—24 ч (вода должна стать бесцветной) кусочки помещают в

70% йодированный спирт для удаления из тканей осадков дихлорида ртути. С этой целью к 70% спирту прибавляют несколько капель 90% спирта, содержащего в 100 мл 2г йода и 3г йодида калия, до получения раствора цвета крепкого чая. Отмывание дихлорида ртути ведут в нескольких порциях йодированного спирта, меняя его через 18—24 ч до прекращения просветления (растворение осадка дихлорида ртути обесцвечивает спирт).

После фиксации жидкостью Ценкера рекомендуется заливка в целлоидин или целлоидин-парафин, так как заливка в парафин приводит к значительному сжатию и сморщиванию тканевых структур.

**Жидкость Максимова** (ценкер-формол). Фактически представляет собой видоизмененную жидкость Ценкера, в которой ледяная уксусная кислота заменена формалином. Фиксатор широко применяют для гематологических исследований. Дает хорошее окрашивание клеток крови и позволяет выявлять их специфичную зернистость. Состав и способ употребления:

Жидкость Мюллера 100 мл

Дихлорид ртути 5г

Формалин 10мл

Время фиксации 6ч. Толщина кусочков не больше 5 мм. Дальнейшая обработка и заливка те же, что и после фиксации в жидкости Ценкера.

Если к жидкости Максимова добавить 10 мл 2% раствора осмиевой кислоты и увеличить время фиксации до 24 ч, можно одновременно получить осмиривание жира.

Примечание. Дихлорид ртути является сильнодействующим ядом, поэтому употребление и хранение реактива требуют соблюдения правил, предусмотренных для веществ группы А.

**Жидкость Карнуа.** Служит хорошим фиксатором как для гистологических исследований (ядра), так и для многих гистохимических методик (нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды). Недостатком является легкое сморщивание цитоплазмы и соединительной ткани.

Этиловый спирт абсолютный 60 мл (при отсутствии можно заменить 96% спиртом)

Хлороформ 30 »

Уксусная кислота ледяная 10 »

Жидкость Карнуа приготавливают перед фиксацией. Кусочки толщиной до 5 мм фиксируют в течение 1—5 ч (в зависимости от толщины объекта). После фиксации кусочки сразу переносят в абсолютный спирт (если фиксатор был приготовлен на 96% спирте, то кусочки следует ополоснуть 2-3 раза в 96% спирте, где в случае необходимости можно оставить их на 2-3 ч).

Примечание. Надо следить, чтобы материал находился в фиксаторе не дольше, чем это нужно для полного его пропитывания, так как удлинение фиксации усиливает сжатие и уплотнение объекта.

**Фиксатор ФСУ** (формалин, спирт, уксусная кислота) **Бродского.**

Рекомендуется для изучения структуры тканей и количественного цитохимического анализа нуклеиновых кислот. Преимущество ФСУ перед

фиксатором Карнуа в том, что формалин подавляет активность ферментов, разрушающих нуклеиновые кислоты (нуклеазы) в фиксируемых клетках, благодаря чему количественно лучше сохраняются ДНК и РНК.

Состав и способ употребления:

Формалин нейтральный неразведенный 3 части

Спирт этиловый 96% 1 часть

Уксусная кислота ледяная 0,3 части

Кусочки тканей 2х2 или 2х3 мм; время обработки 1—4 ч в зависимости от свойств объекта.

После фиксации кусочки промыть водой в течение 12ч или (для цитохимических целей) в течение того же времени тремя сменами 70% спирта. Быстро обезводить и залить в парафин.

### **5.3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3. Пропитывание и заливка материала в парафин.**

Для того, чтобы добиться получения тонких срезов (в тысячные доли миллиметра), зафиксированный материал необходимо соответствующим образом подготовить: сделать достаточно плотным и в то же время нехрупким, чтобы при резке он не крошился и не деформировался, а срезался тонкими ровными слоями. Для этого ткань следует освободить от излишков фиксатора, обезвредить, пропитать и залить какой-нибудь уплотняющей средой.

#### Промывание

Цель этой процедуры — освободить исследуемый объект от излишнего количества фиксатора. Способ промывания зависит от методики фиксации. Например, после фиксирующих смесей, содержащих пикриновую кислоту, дихлорид ртути, трихлоруксусную кислоту, применяют этиловый спирт разной концентрации. После фиксации в формалине, в жидкостях, содержащих хром, осмиевую кислоту, обычно употребляют воду. В большинстве случаев промывку кусочков тканей производят в проточной водопроводной воде. Наиболее удобно это делать, помещая объект в марлю и подвешивая за нитку в сосуд, наполненный водой. Верх сосуда закрывают марлей и проделывают в ней небольшое отверстие. На водопроводный кран натягивают резиновый шланг или привязывают шнур (полоску бинта), свободный конец которого пропускают через марлю в сосуд и пускают по нему несильную струю воды. Среднее время промывания 20—24 ч.

#### Обезвоживание

Начиная с этого этапа и до самого конечного момента приготовления микропрепарата следует строго придерживаться правила постепенного воздействия применяемых веществ на исследуемые структуры.

После промывания кусочки подвергают дальнейшему уплотнению путем обезвоживания в спиртах увеличивающейся концентрации.

Для проведения процедуры приготавливают необходимое количество бюксов или стаканчиков с притертыми крышками, этикетируют их и заливают спиртами: 50, 60, 70, 80 и 96% (по два стаканчика), 100% (два стаканчика). Такой последовательный ряд сосудов получил название гистологической батареи.

Спирты нужной крепости приготавливают заранее по специальной таблице разведения из 96% спирта.

100 мл спирта	96% спирт	H <sub>2</sub> O	90% спирт	H <sub>2</sub> O	80% спирт	H <sub>2</sub> O	70% спирт	H <sub>2</sub> O
50%	52	48	56	44	63	37	71	29
60%	63	37	67	33	75	25	86	14
70%	73	27	78	22	88	12	—	—
80%	83	17	89	11	—	—	—	—
90%	94	6	—	—	—	—	—	—

*Способ приготовления абсолютного спирта.* Обычный спирт-ректификат содержит 96% чистого спирта и 4% воды. Для того чтобы получить абсолютный спирт, необходимо извлечь воду. Наиболее распространенным способом является обезвоживание при помощи прокаленного медного купороса (сульфат меди).

В основе этого метода лежит свойство сульфата меди отдавать и присоединять молекулы воды, меняя при этом свой цвет (прокаленный сульфат меди имеет вид серовато-белого порошка, который по мере присоединения воды приобретает синюю окраску).

Насыпав порошок прокаленного медного купороса (примерно 10 г на 100 мл спирта) в чистую стеклянную бутылку с притертой пробкой, наливают туда же 96% спирт. Затем бутылку встряхивают до равномерного распределения порошка. Подобную процедуру повторяют на протяжении 1—2 дней. По мере поглощения воды порошок приобретает синюю окраску. Однократная обработка, как правило, не дает обезвоживания, поэтому спирт переливают в другой сосуд, содержащий свежую порцию сульфата меди. Подобную процедуру повторяют до тех пор, пока осадок не перестанет приобретать голубой цвет. Обезвоженный спирт отфильтровывают в чистую посуду, которую плотно закрывают. Желательно проверить pH абсолютного спирта, так как после обработки сульфатом меди он может стать слегка подкисленным. Для нейтрализации достаточно прибавить небольшое количество карбоната кальция (CaCO<sub>3</sub>).

Если в лаборатории нет фабричного порошка безводного сульфата меди, то его можно приготовить самим, прокалив кристаллическую соль в сушильном шкафу при температуре 100<sup>0</sup>С в широкой фарфоровой чашке (до тех пор, пока из синих кристаллов не образуется белый порошок). Для

равномерного прокаливания необходимо перемешивать купорос стеклянной палочкой. Нельзя допускать почернения (особенно заметного по краям чашки), свидетельствующего о перекаливании. Таким же путем обрабатывают медный купорос, оставшийся после обезвоживания спирта.

Следует помнить, что порошок медного купороса сильно раздражает слизистые оболочки. Нужно проводить прокаливание в вытяжном шкафу или же защищать слизистые оболочки носа и рта обычной марлевой маской.

Испытание абсолютного спирта на содержание воды производят опусканием в него нескольких зерен карбида кальция. Появление характерного запаха ацетилена и помутнение свидетельствуют о наличии воды. Более грубый способ — прибавление нескольких капель абсолютного спирта к 4-5 мл бензола или ксилола. Помутнение жидкости указывает на то, что спирт содержит около 3% воды.

Если препарат промывали в воде, то обезвоживание начинают с 50% спирта, если же в спиртах (после жидкости Ценкера и др.), то объект помещают в спирт последующей крепости (из 70% в 80% и т.д.). При тонких цитологических исследованиях обезвоживание начинают с 10-20% спирта.

Время пребывания кусочков в отдельных спиртах определяется их величиной и свойствами. Объекты средней величины (толщиной 5 мм) достаточно держать в слабых спиртах (до 60%) по 2—4 ч, а в более крепких — от 12 до 24 ч. Мелкие и более тонкие объекты можно проводить соответственно быстрее.

Для того чтобы спирт проникал в ткани равномерно со всех сторон, объект помещают на слой ваты (обычной или стеклянной) или подвешивают в стеклянном сите. При таком расположении кусочков спирт, отнимающий воду из тканей и стекающий ко дну, не мешает дальнейшему обезвоживанию.

Следует помнить, что длительное пребывание объекта в спиртах низкой концентрации приводит к мацерации тканей, в то время как передержка в спиртах высокой концентрации чрезмерно уплотняет их. Поэтому, если необходимо прервать процесс обезвоживания, то материал можно оставить (на несколько дней) в «индифферентном» спирте, крепость которого составляет 70-80%.

Необходимо также учитывать, что спирты в процессе обезвоживания довольно быстро загрязняются экстрагируемыми из тканей веществами и особенно жирами. Не следует использовать длительное время одни и те же спирты. Необходимо своевременно их менять.

*В процессе обезвоживания могут быть допущены ошибки:*

- 1) переуплотнение при полном обезвоживании;
- 2) нормальное уплотнение при недостаточном обезвоживании.

Оба эти недостатка являются следствием несоблюдения оптимальных условий обезвоживания и отрицательно сказываются на дальнейшей обработке материала.

Перед тем как перенести объект в 96% или абсолютный спирт, следует придать кусочку окончательную форму и размеры (обрезать поврежденные

или излишние участки). Для полного обезвоживания следует проводить материал последовательно через две порции абсолютного спирта (по 12-24 ч). При проведении кусочков из раствора в раствор желательно их подсушивать на фильтровальной бумаге в течение нескольких секунд, чтобы последующие растворы не загрязнялись предыдущими.

Приготовление высококачественных микропрепаратов требует наличия равномерно тонких срезов с исследуемого объекта. Для того чтобы их получить, кусочки тканей надо пропитать и залить такой средой, которая превратила бы их в хорошо режущуюся массу.

Наиболее употребительными для этих целей материалами являются парафин, целлоидин и желатин.

#### Заливка в парафин

+ - относительная быстрота заливки (в течение 1-2 дней после обезвоживания),

- возможность приготовления серийных срезов, а также тонких срезов для цитологических исследований (толщина 2-3 мкм),

- удобство хранения блоков и неокрашенных срезов (практически неограниченное время).

К недостаткам метода следует отнести

- значительное сжатие исследуемого материала (до 20%), вызываемое воздействием высокой температуры в процессе пропитывания парафином.

- богатые водой, рыхлые ткани малоприспособлены к заливке в парафин.

- необходимость удаления парафина из срезов перед их окраской.

Парафин при комнатной температуре - твердое гомогенное вещество. Существует несколько сортов парафина: мягкие (точка плавления 45-54°C) и твердые (точка плавления 58-60°C).

В большинстве случаев для заливки применяют парафин с точкой плавления 54-56°C. Если резка предполагается при низкой температуре окружающей среды, то лучше применять парафин с более низкой точкой плавления (48-50°C). Нужная степень твердости парафина достигается смешиванием в различных комбинациях мягких и твердых сортов.

Если точка плавления парафина неизвестна, ее можно определить. Для этого расплавленный парафин насыщают в тонкий стеклянный капилляр и дают ему застыть. Затем очищают капилляр снаружи от приставшего парафина и вместе с градусником опускают в химический стаканчик с водой, которую начинают постепенно нагревать, перемешивая стеклянной палочкой. Как только парафин в капилляре начнет расплавляться, отмечают температуру, которая и укажет точку его плавления.

Следует помнить, что обычный продажный парафин часто содержит газообразные примеси, которые при заливке образуют пузырьки, придающие парафину повышенную ломкость и значительно ухудшающие качество резки материала. Для избавления от этих примесей свежий парафин следует на длительное время оставить в расплавленном виде в плоских чашках (чтобы увеличить площадь для выделения газов) при температуре 70°C (для этого можно приспособить сушильный шкаф). Можно также подвергать парафин

частому расплавлению и нагреванию (до появления дыма) с последующим быстрым охлаждением.

Если парафин, несмотря на соответствующую подготовку, сохраняет жесткость, к нему следует добавить чистый пчелиный воск в количестве 2-5%, что придаст парафину большую эластичность.

Заливка в парафин требует тщательного соблюдения двух основных условий:

- 1) препарат должен быть полностью обезвожен,
- 2) не должен содержать спирт.

Первое условие, как мы уже знаем, обеспечивается в процессе обезвоживания и уплотнения в батарее спиртов повышающейся концентрации.

Удаление спирта. Для удаления спирта и подготовки к пропитыванию парафином материал обрабатывают одним из растворителей парафина, обладающим способностью вытеснять спирт. К таким веществам относятся хлороформ, бензол, толуол, ксилол, сероуглерод и др. Чаще используют хлороформ и бензол. Толуол и ксилол делают кусочки более твердыми.

Следует помнить, что продажный разливной хлороформ может содержать воду, что несовместимо с требованиями, предъявляемыми к веществам, применяющимся в процессе подготовки объекта к пропитыванию. Для освобождения хлороформа от спирта и воды его настаивают длительное время над хлоридом кальция. Хранят хлороформ в темноте, так как на свету он легко разлагается.

#### Методика пропитывания.

Обезвоженные и уплотненные кусочки перекладывают из абсолютного спирта в смесь абсолютного спирта с хлороформом (1 : 1) на 2-3 ч, а затем в чистый хлороформ, где они вначале плавают (выступая над его поверхностью), а затем по мере пропитывания постепенно погружаются. В процессе удаления спирта хлороформ меняют 2-3 раза на протяжении 1/2-3 ч (в зависимости от свойств объекта и толщины кусочков). При величине кусочка 1 X 1 см его держат в хлороформе 30 мин. Затем, соблюдая принцип постепенного замещения хлороформа парафином, помещают объект в смесь из равных частей парафина (желательно мягкого) и хлороформа. Эта смесь, застывающая при комнатной температуре, при нагревании до 37°C расплавляется и приобретает жидкую консистенцию. Кусочки находятся в хлороформ-парафине при 37°C в течение 3-6 ч (при 56°C время сокращают до 30 мин - 1 ч). При необходимости отсрочить дальнейшую обработку материала можно после погружения объекта в смесь хлороформа с парафином извлечь сосуд из термостата и оставить при комнатной температуре на ночь (или даже на несколько дней) в закрытом состоянии, а затем, вновь расплавив в термостате при 56°C, перенести в рядом стоящий горячий парафин для пропитывания. Излишнее пребывание объекта в растопленном хлороформ-парафине ухудшает качество резания.

Для полного освобождения объекта от хлороформа кусочки проводят последовательно через две-три порции расплавленного парафина. Время

пребывания в парафине зависит от величины кусочков и свойств ткани. Кусочки толщиной 2-5 мм должны в общей сложности находиться в парафине 2-5 ч.

Если объект хорошо обезвожен и не содержит спирта, задержка в парафине не ухудшает качество объекта даже при пропитывании в течение нескольких дней. При наличии же в кусочках остатков воды и спирта результаты обработки ухудшаются прямо пропорционально длительности излишнего пребывания объекта в расплавленном парафине. Парафин для пропитывания можно применять многократно, но при этом нужно строго следить за тем, чтобы не перепутать порции парафина. Для этого бюксы (или стаканчики) необходимо обозначить соответствующими цифрами (1, 2, 3).

### **Заливка в парафин.**

После окончательного пропитывания объекта его заливают расплавленным парафином, специально приготовленным для этих целей и хранящимся в термостате.

В качестве формочек для заливки используют разнообразные приспособления.

Г-образные гладкие угольники изготовляют из металла (латунь, свинец, сталь). Рекомендуются применять угольники, длинная сторона которых равна 8-10 см, короткая - 3 см, высота - 1,5-2 см. Угольники кладут на отполированную металлическую или стеклянную пластину и, сдвигая углы, создают формочку нужных размеров.

Бумажные коробочки изготовляют из листка плотной бумаги, применяют также фольгу, только в этих случаях следует сразу после заливки еще в жидкий парафин погрузить часть бумажной этикетки. Удобство бумажных формочек заключается в возможности значительно варьировать их размеры, простоте маркировки (простым карандашом на стенках) и длительном хранении залитого материала.

Для заливки мелких объектов можно применять часовые стекла, четырехугольные фарфоровые ванночки из-под акварельной краски и другие приспособления.

Заливку осуществляют следующим образом. Предназначенный для заливки парафин подогревают до 58-60°C и аккуратно наливают в приготовленную формочку, заполняя ее до самых краев и избегая образования пузырьков воздуха (хорошо иметь для этих целей высокую фарфоровую кружку с ручкой и носиком). Затем подогревают пинцет или металлический шпатель, быстро переносят подготовленный к заливке объект в формочку с парафином и ориентируют в необходимом положении. После этого формочку охлаждают водой (10-18°C). Если заливку производят с помощью металлических угольников, то пластину помещают в плоскую чашку таким образом, чтобы нижняя ее поверхность не соприкасалась с дном сосуда (на стеклянные или металлические палочки). Затем осторожно наливают воду до верхних краев формы (не заливая поверхность) и дают парафину застыть. При заливке в бумажной коробочке ее постепенно

опускают в сосуд с водой и оставляют плавать до полного застывания парафина.

В процессе застывания поверхность блока кратерообразно стягивается, что необходимо учитывать при выборе высоты формы. Если форма недостаточно высокая или залита не полностью и парафин лишь тонким слоем покрывает объект, то при застывании верхняя часть кусочка будет выступать из блока.

Этикетировка материала должна производиться непосредственно перед заливкой, иначе кусочки легко могут быть перепутаны, особенно при заливке нескольких объектов в одной форме. Для этого при употреблении бумажных коробочек соответствующие данные наносят простым карандашом на стенку формочки. Если же блок должен быть извлечен из формы, то бумажную полоску с обозначениями вставляют в парафин до его застывания и, если нужно, делают дополнительные пометки на поверхности застывшего парафина препаровальной иглой или скальпелем.

Следует помнить, что:

1) при застывании парафин плотно прилипает к стеклу и отделяется с трудом, поэтому поверхность стеклянных приспособлений перед заливкой необходимо смазывать глицерином;

2) медленный перенос объекта в форму с парафином и употребление недостаточно нагретых инструментов (особенно, если в лаборатории прохладно) приводит к образованию на поверхности кусочков парафиновой пленки, значительно ухудшающей качество заливки;

3) применение очень холодной воды (температура ниже 10-8°C) приводит к стягиванию блока со всех сторон и деформации, а иногда и к трещинам;

4) медленное застывание блоков на воздухе, а также застывание под водой ухудшают качество заливки.

При хорошей заливке блок должен иметь плотную и однородную консистенцию. Рыхлые молочно-белые включения свидетельствуют о плохом качестве блока и значительно ухудшают резку материала, а иногда делают ее невозможной.

Таким образом, процесс заливки в парафин может быть представлен следующей схемой:

- промывание после фиксации,
- обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации (в 50 и 60% по 4-6 ч; в 70, 80 и 90% по 8-12 ч и в двух порциях 100% спирта по 12-24 ч),
- проведение через смесь из абсолютного спирта и хлороформа (2-3 ч),
- погружение в чистый хлороформ (две-три смены в течение 1ч),
- пропитывание в хлороформ-парафине (при 37°C 3-6ч), при 56°C 30мин-1ч),
- пропитывание в парафине (в трех порциях по 1-1/2 ч),
- заливка в парафин.

Если вместо хлороформа применять ксилол, то на соответствующих этапах сроки сокращаются примерно в 2 раза.

В тех случаях, когда по условиям работы необходимо *сократить время* приготовления парафиновых блоков, можно применить ускоренную заливку. Для этого кусочек ткани толщиной 1,5-2мм помещают в абсолютный (или 96%) спирт либо ацетон (для фиксации и обезвоживания) на 1-2 ч, производя при этом однократную смену фиксатора.

Затем объект проводят в течение 1ч через две смены чистого хлороформа (подогретого в термостате до 37°C), перекладывают на 30-60 мин в смесь хлороформа с парафином (1:1), после чего пропитывают в парафине 2 раза (по 45-60 мин) и заливают. При таком режиме весь процесс от взятия материала до заливки занимает 8-9 ч. Однако качество препарата ухудшается в основном в результате быстрого отнятия воды в спирте (или ацетоне). Поэтому применять этот метод нужно только в крайних случаях.

За последние годы в лабораторной практике применяют способ *одновременной заливки* кусочков от нескольких сравниваемых органов в единый блок. Для этого подлежащие совместной заливке объекты проводят по спиртовой батарее одновременно и на том этапе, когда необходимо придать кусочкам окончательную форму, обрезают их края так, чтобы в нужной комбинации они могли тесно прилегать друг к другу и в то же время имели бы различную форму, позволяющую определить принадлежность каждого объекта. После этого кусочки проводят вместе через промежуточные среды, парафины для пропитывания и укладывают в формочку для заливки в определенном порядке, стараясь сблизить края в процессе заливки. Схему расположения кусочков и их обозначение сразу же заносят в протокольную тетрадь.

Подобные комбинированные блоки можно составлять и из уже залитых отдельно кусочков, придав им в твердом состоянии необходимую форму и поместив затем в горячий парафин, находящийся в термостате. После полного расплавления парафина кусочки заливают вместе в единый блок. Из удачно залитого блока, содержащего два, три, четыре кусочка, можно приготовить хорошие, ровные срезы. Такие комбинированные срезы незаменимы при гистохимических исследованиях. Оценку гистохимической реакции проводят по интенсивности окраски исследуемых микроструктур, а это значит, что сравниваемые срезы должны иметь одинаковую толщину и находиться в равных условиях при проведении как самой гистохимической реакции, так и остальных этапов обработки препаратов. Все эти условия и обеспечиваются при данном способе. Помимо этого, значительно облегчается микроскопирование препаратов, и создаются условия для одновременного изучения сравниваемых срезов в общем поле зрения (при малых увеличениях).

Приготовление гистологических препаратов из комбинированных блоков (конечно, когда это оправданно) имеет и ряд технико-экономических преимуществ, так как сокращает время резки и всех последующих этапов обработки срезов, а также потребление стекол, реактивов и других материалов прямо пропорционально количеству залитых кусочков.

Наклейку блоков производят на деревянные кубики. Для этого из затвердевшего парафина скальпелем вырезают четырехугольный блок таким образом, чтобы объект со всех сторон был окружен слоем парафина толщиной 1-3 мм. Затем, положив на деревянный кубик небольшой кусочек твердого парафина, расплавляют его горячим металлическим шпателем (или скальпелем), проводят этим же шпателем по нижней поверхности парафинового блока и быстро придавливают его к кубику.

#### **5.4. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4. Микротом и работа с ним. Приготовление гистологических срезов. Метод замораживания тканей.**

##### *Микротомы и работа с ними*

Микротом — специальное механическое устройство, предназначенное для приготовления гистологических срезов определенной толщины.

Отечественная промышленность выпускает три типа микротомов:

1) санный (МС-2) — для получения парафиновых и целлоидиновых срезов;

2) ротационный - предназначенный для получения серийных срезов материала, залитого в парафин;

3) замораживающий — микротом, имеющий специальное устройство для замораживания объекта, что позволяет резать нефиксированный, свежий материал.

##### ***Саный микротом (МС-2)***

Прибор получил название благодаря тому, что нож и механизм подачи с зажимом для блока (объектодержателем) движутся на специальных салазках.

Основные части микротомата: станина, механизм микроподдачи, механизм подъема, зажим для блоков (объектодержатель), ножевые салазки с ножедержателем.

##### ***Микротом для парафиновых срезов (МПС-2)***

Прибор состоит из основания, приводного механизма, механизма микроподдачи, объектодержателя, ножедержателя с механизмом подачи транспортной ленты, транспортера.

##### ***Микротом замораживающий***

Как и предыдущие модели микротомов, замораживающий микротом построен по санному принципу, но имеет особенности конструкции и монтажа. Основные узлы: станина, механизм подъема, ножедержатель, замораживающий столик.

Замораживающий столик состоит из корпуса, в который впаяна трубка, подающая углекислоту к ножу, гибкий шланг (для подводки углекислоты от баллона к столику) и ввернуты два клапана для подачи углекислоты под крышку столика и в трубку, охлаждающую нож. На верхнюю часть корпуса столика наверхнута ребристая крышка для размещения объекта с отверстиями для выхода углекислоты.

### ***Микротом-криостат (МК-25)***

Широкое развитие гистохимических методов исследования ферментов и других быстроразрушающихся веществ потребовало создания специального аппарата для приготовления свежемороженых срезов — криостата.

Криостат представляет собой холодильник, в рабочей камере которого •установлен микротом. Сравнительно небольшой объем камеры, надежная теплоизоляция ее стен, а также наличие специального регулирующего механизма позволяют поддерживать внутри камеры постоянную заданную минусовую температуру (от  $-5^{\circ}$  до  $-25^{\circ}\text{C}$ ). Работу в камере производят через отверстия для рук, закрытые диафрагмами. Диаметр отверстия регулируется по размерам руки поворотом наружного кольца. Установленная в камере люминесцентная лампа и смотровое окно обеспечивают хорошее наблюдение за проводимыми манипуляциями. Задняя стенка камеры имеет люк для подхода к терморегулирующему вентилю.

Постоянный температурный режим в рабочей камере позволяет получать более тонкие, чем на обычном замораживающем микротоме, срезы (3-4 мк), предупреждает их свертывание и обеспечивает возможность наклеивать срезы на предметные стекла без клеящих средств. Для уменьшения охлаждения рук можно применить нитяные перчатки, обрезав у них кончики пальцев.

#### **Уход за микротомом**

Хорошее состояние скользящих поверхностей — их чистота и гладкость — является основным условием для точной работы микротомом.

Салазки и направляющие дорожки должны тщательно охраняться от запыления и загрязнения. Для этого, когда микротом не работает, его закрывают специальным футляром или чехлом. Скользящие поверхности должны быть постоянно смазаны тонким слоем нейтрального костного или вазелинового масла, что не только обеспечивает легкость скольжения, но и предупреждает появление ржавчины. Периодически (для удаления загрязненной смазки) скользящие поверхности микротомом необходимо протирать тряпочкой, смоченной бензином или толуолом, после чего сразу смазать их.

Помимо чистки и смазки скользящих поверхностей, необходимо проверять правильность затяжки винтов, которыми укреплены направляющие пластины и другие части прибора.

Следует избегать частого перемещения микротомом с одного места на другое, так как при этом может быть нарушена точность прибора.

#### **Микротомные ножи**

Резку исследуемого объекта на микротоме производят с помощью специальных микротомных ножей.

Существует несколько разновидностей микротомных ножей. В основу их классификации положена форма лезвия. Ножи типа А имеют одну поверхность вогнутую, а другую ровную. У ножей типа В вогнутость менее выражена. Ножи типа С имеют ровную поверхность с обеих сторон. Сужение ножа от спинки к режущему краю довольно значительное, благодаря чему

торцовая часть имеет характерный вид, по которому легко определить тип ножа.

Режущий край микротомного ножа в отличие от обычной бритвы имеет так называемый фасеточный шлиф, т.е. угол сечения лезвия, образующийся в результате заточки лезвия под некоторым углом относительно его поверхности.

Ножи *типа А* делают из относительно мягкой стали, применяют при резке мелких объектов, залитых в целлоидин и состоящих из тканей малой и средней плотности (железы, стенка внутренних органов и т.д.).

Ножи *типа В* (имеющие меньшую вогнутость лезвия, чем тип А) изготавливают из более твердой стали и употребляют как для приготовления целлоидиновых срезов, так и при резке материала, залитого в целлоидин-парафин.

Ножи *типа С* (из твердой стали) служат для резки наиболее плотного материала (кость, хрящ, кожа), залитого в различные среды, парафиновых блоков, а также для получения срезов при работе на замораживающем микротоме. Длина ножей может быть различной - от 10 до 50 см.

Следует помнить, что получить хороший тонкий срез можно только при наличии правильно заточенного, очень острого микротомного ножа. Существует ряд способов **точки ножей**, но наиболее надежным до сих пор является ручная точка на специальном точильном камне с последующей шлифовкой на ремне.

Одним из условий успешного затачивания и правки является сохранение такого положения ножа, когда режущий край и плоскость лезвия находятся под углом друг к другу. Для этого нож должен быть снабжен со стороны спинки специальным металлическим приспособлением — обушком. Для удобства во время работы необходимо иметь привинчивающуюся ручку.

Вначале микротомный нож точат на камне, предварительно смоченном водой или маслом, для чего правой рукой нож берут за ручку, а левой — за свободный конец и кладут на противоположный от себя край камня таким образом, чтобы режущая поверхность соприкасалась со всей поверхностью камня по всей его глубине и была обращена в сторону точащего. Для того чтобы все лезвие затачивалось равномерно, ножу придают такое исходное положение, при котором край ножа совпадает с краем камня. После этого начинают точку движением ножа на себя, постепенно смещая нож в сторону с таким расчетом, чтобы во время движения вся режущая поверхность от одного конца ножа до другого прошла по камню.

При этом все время надо следить за постоянным соприкосновением затачиваемого края ножа с поверхностью камня и не надавливать на нож, а лишь водить его в заданном направлении. По окончании движения нож переворачивают через спинку (во избежание повреждения режущего края) и производят движение в обратном направлении. Точку можно считать законченной, если при рассмотрении в микроскоп (при малом увеличении) режущий край выглядит ровным. При хорошем уходе за ножом, правильной

их эксплуатации затачивание занимает 20—30 мин. Запущенные ножи, с крупными зазубринами требуют длительной точки (до нескольких часов).

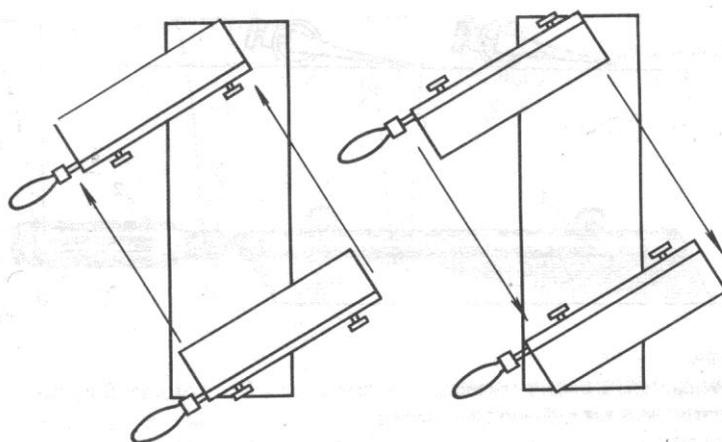


Рис. 70.  
Порядок движения микротомного ножа при точке.

После того как затачивание закончено, нож следует вымыть, насухо вытереть и направить на ремне (**отшлифовать**). Точильный ремень должен иметь твердую основу, иначе затрудняется равномерность движения ножа и стирается угол заточки. Если в лаборатории нет фабричного ремня, его можно сделать самим. Для этого необходимо иметь ремень из натуральной кожи (типа поясного ремня шириной 5-6 см) и четырехгранный брусок с шириной граней, равной ширине ремня, и длиной 25-35 см. С помощью столярного или другого подходящего клея куски ремня плотно приклеивают шероховатой поверхностью наружу. Три стороны ремня покрывают равномерным слоем специальной пасты, которая на каждой стороне различается по составу, а четвертую оставляют свободной.

Правку микротомного ножа производят при помощи таких же движений, как и затачивание, только нож располагают на ремне таким образом, чтобы во время движения на себя он был обращен к точащему спинкой, а не режущим краем, как во время точки. Вначале правят на стороне, покрытой грубой пастой (№ 1), затем переходят последовательно на более нежные пасты (№ 2 и 3) и заканчивают шлифовкой на чистом ремне. По каждой поверхности проводят по 20—30 раз. Хорошо отточенный и направленный микротомный нож должен легко перерезать поддерживаемый за один конец человеческий волос и не оставлять борозд на поверхности парафинового блока при его резке.

Для того чтобы придать устойчивость точильному камню и предохранить его от поломки, рекомендуется вставить камень в деревянную оправу, которая должна быть ниже его верхнего края на 0,5—1 см. Рекомендуется также при затачивании и правке бритв камень и ремень закреплять на столе.

## **Правила резания на микротоме**

Предпосылкой для получения хороших гистологических срезов служит правильный выбор угла наклона ножа и угла резания .

Под углом наклона понимают угол, образуемый нижней поверхностью ножа с плоскостью резания. Наилучшим считается такой угол наклона, при котором плоскость заточки ножа расположена параллельно верхней поверхности блока. Обычно он равен 13-15°. Если нож установлен так, что угол наклона больше оптимального, то срез будет крошиться, если меньше — резка невозможна, так как лезвие ножа будет лишь скользить по поверхности блока.

Под углом резания подразумевают угол между длинной осью ножа и воображаемой линией, идущей через центр блока параллельно движению салазок, несущих нож. Величина угла резания зависит от свойств обрабатываемого, материала: чем он мягче, тем угол меньше, и, наоборот, чем тверже, тем угол больше. При косом расположении ножа уменьшается сопротивление его режущего края поверхности блока, что облегчает резку мягких блоков. Максимальный угол резания равен 90°, минимальный — 20-30°.

Способ приготовления гистологических срезов зависит от вида заливки и свойств самого материала.

## **ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕЗОВ ИЗ ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ**

**Резание.** Наклеенный на деревянную колодку парафиновый блок прочно закрепляют в зажиме микротоме, расположив длинной осью параллельно длиннику микротоме. Затем, установив необходимый угол резания и правильный угол наклона ножа, его прочно закрепляют винтовыми зажимами и располагают над блоком. После этого, регулируя винтами механизм подачи, блок устанавливают таким образом, чтобы верхняя его плоскость находилась в горизонтальном положении и не доходила до лезвия ножа на 0,5-1 мм. Когда предварительная подгонка блока к ножу закончена, устанавливают микрометрическую шкалу на получение толстых (25—30 мкм) срезов и движением ножевых салазок начинают подавать блок вверх до получения с него первых полных срезов. Затем производят моделирование блока: срезают скальпелем избыточный парафин, оставляя вокруг залитого объекта слой не более 2—3 мм, и придают блоку прямоугольную форму. После этого устанавливают микрометрическую шкалу на нужную толщину среза и приступают к окончательной резке материала.

Готовый срез осторожно снимают с ножа влажной кисточкой (в направлении от спинки к лезвию) и переносят либо на подготовленное предметное стекло, либо в чашку с теплой (35—40° С) дистиллированной водой. Воду предварительно кипятят, чтобы предупредить появление на нижней поверхности срезов пузырьков воздуха (который может быть растворен в воде), мешающих равномерному приклеиванию срезов к стеклу. Помещают срезы на воду (предметное стекло) обязательно поверхностью,

прилежащей к ножу, определить которую можно по характерному блеску (верхняя сторона всегда матовая).

При резке надо следить, чтобы волоски от кисточки не попадали под режущий край ножа, так как это приводит к повреждению лезвия.

Для ряда исследований необходимо получение серийных срезов. Очень важно не перепутать очередность серийных срезов при наклеивании на предметное стекло. Для этого ленту срезов разрезают скальпелем на отдельные фрагменты и укладывают всегда в определенном порядке вдоль или поперек стекла. В зависимости от величины объекта и размера предметного стекла на одном стекле может разместиться различное количество срезов (от 2—4 до 25—30).

### **Возможные погрешности при изготовлении парафиновых срезов**

Для того чтобы получить хорошие гистологические срезы, необходимо уметь своевременно распознать и устранить причину, ухудшающую качество срезов.

**Срез крошится.** Причины:

- 1) твердый парафин;
- 2) низкая температура окружающей среды;
- 3) медленное охлаждение парафина при заливке;
- 4) большой угол наклона ножа.

*Устранение:*

1) перезалить материал в более мягкий парафин после предварительного растапливания блока в термостате;

2) дышать на поверхность блока (согревание) перед каждым движением ножа или приспособить над блоком электрическую лампочку;

3) изменить угол наклона ножа.

**Залитый материал в процессе резки выпадает из окружающей массы парафина.** Причины:

1) при переносе кусочка в формочку для заливки произошло его охлаждение;

2) заливка произведена охлажденным парафином;

3) недостаточное удаление спирта перед пропитыванием.

*Устранение:*

- в первом и втором случаях необходимо блок растопить в термостате и залить заново, строго соблюдая правила заливки,
- в третьем случае после предварительного растапливания материал переносят в промежуточные среды (для удаления спирта), затем вновь пропитывают и заливают.

**Плоскость среза неровная, материал плохо режется или совсем не режется, нож подскакивает над поверхностью блока.** Причина — переуплотнение материала при проводке и фиксации. *Устранение невозможно.* Можно лишь несколько размягчить материал, если на поверхность резания перед каждым движением ножа наносить кисточкой слой горячего парафина (дав ему затем остыть) или дышать на поверхность блока.

**Срезы закручиваются, прилипают к поверхности ножа, мнутся.**

Причины:

- 1) малый угол наклона ножа;
- 2) мягкий парафин;
- 3) высокая температура окружающей среды.

*Устранение:*

- 1) изменить угол наклона;
- 2 и 3) перезалить материал в более твердый парафин или охладить блок путем помещения перед резкой в холодильник (можно также положить на поверхность резания кусочек льда).

**Приклеивание, сморщивание или разрыв срезов,** особенно при резке органов, богатых костной, хрящевой или плотной соединительной тканью, могут быть следствием их электризации. *Устранение:* помещать на лезвие (в месте прохождения среза) каплю воды, дышать на лезвие и блок, натирать участок лезвия и прилежащую часть ножа куском твердого парафина.

**Срезы разрываются или покрыты бороздами.** Причины:

- 1) зазубрины на лезвии ножа;
- 2) грязный парафин (плотные соринки царапают срез и портят лезвие);
- 3) материал плохо декальцинирован.

*Устранение:*

- 1) точка и правка ножа или перемещение в ножедержателе;
- 2) перезаливка в чистый парафин;
- 3) устранить нельзя.

**Плоскость среза не однородна** (беловатая в средней части). Причина — недостаточное обезвоживание.

*Устранение:* расплавление блока и проведение материала через промежуточные среды до абсолютного спирта. После обезвоживания проводят через промежуточную среду, пропитывают и заливают.

**Наклеивание.**

Приготовление раствора. К белку из свежего куриного яйца добавляют равное по объему количество химически чистого глицерина и хорошо взбалтывают (или взбивают). Приготовленный раствор фильтруют через влажный складчатый бумажный фильтр в чистый флакончик. Во избежание гниения белка к фильтрату добавляют 2—3 маленьких кусочка (с пшеничное зерно) тимола или формалин (1:100). В хорошо закрытом сосуде раствор сохраняется длительное время.

Подготовку предметных стекол к наклеиванию следует произвести до начала резки парафинового блока на микротоме, поместив на тщательно очищенную поверхность стеклянной палочкой небольшую каплю раствора белка с глицерином и растерев ее до получения равномерного слоя. Растирание можно производить пальцем (предварительно протерев его ваткой, смоченной эфиром) или тонкой чистой льняной тряпочкой. Приготовив предметные стекла, приступают к резке парафинового блока (см. выше).

Существует несколько способов расправления и наклеивания срезов.

1. Если срезы были перенесены для расправления в теплую воду, то смазанное белком с глицерином предметное стекло подводят в наклонном положении под плавающие срезы, натягивают их на стекло с помощью кисточки или препаровальной иглы и придают им правильное положение. Затем удаляют излишнюю воду (наклонив стекло и осторожно придерживая срезы за парафиновую каемку), кладут стекла на планшеты и помещают в термостат или сушильный шкаф (при 42—45°C) на 24ч, где и происходит окончательное высушивание и приклеивание срезов. Можно высушивать и при комнатной температуре, предохраняя при этом срезы от запыления, но тогда лучше выдерживать их 36—48ч.

2. Если срезы перенесены с ножа непосредственно на смазанное белком с глицерином предметное стекло, то их можно наклеивать по-разному.

**Влажный способ.** На стекло с помощью пипетки наносят несколько капель прокипяченной дистиллированной воды и получают плавающие срезы. Затем стекло осторожно подогревают над спиртовкой и добиваются полного расправления срезов. При этом следует избегать перегревания, так как расплавление парафина приводит к повреждению среза.

**Сухой способ.** Плоской (не слишком мягкой) кисточкой прижимают один край среза к предметному стеклу, затем осторожно проводят по всему срезу, расправляя и раскручивая его. После этого срез прижимают кисточкой к стеклу так, чтобы между его нижней поверхностью и стеклом не оставалось пузырьков воздуха, и быстро подогревают над слабым пламенем спиртовки (не перегревать!). В результате коагуляции белка срез прочно приклеивается к предметному стеклу и может быть сразу подвергнут дальнейшей обработке без подсушивания.

Недостаток сухого наклеивания в том, что тонкие и нежные срезы легко повреждаются и плохо расправляются, поэтому оно применимо далеко не всегда.

В тех случаях, когда нежелательно наличие белково-глицеринового слоя, срезы можно наклеивать с помощью дистиллированной воды или 30% спирта. При этом способе предметные стекла должны быть обезжирены особенно тщательно, так как в противном случае вода неравномерно распределится по стеклу и срез плохо приклеится. Способ наклеивания довольно прост: на стекло наносят воду (или 30% спирт) и на нее кладут срезы блестящей стороной книзу; затем нагревают, расправляют, удаляют воду и сушат, как описано выше.

Качество приклеивания срезов определяют, рассматривая их со стороны стекла, которое держат в наклонном положении. Если срезы кажутся матовыми, то приклеивание хорошее, если имеются участки, отсвечивающие, как зеркало, то между срезом и стеклом находится слой воздуха и в этом месте приклеивание не произошло. Такие срезы при дальнейшей обработке легко соскальзывают со стекла. Обычно воздушная прослойка появляется при недостаточной чистоте предметного стекла или слишком низкой температуре сушильного шкафа. Предотвратить соскальзывание таких срезов можно путем целлоидиновой защиты.

Примечание. Пребывание срезов в теплой воде необходимо сократить до минимума, так как иначе могут произойти набухание соединительной ткани (особенно при фиксации в жидкостях, содержащих трихлор-уксусную и пикриновую кислоты), растворение и вымывание некоторых веществ, входящих в состав тканей.

### **5.5. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5. Депарафинирование парафиновых срезов. Гистологическое окрашивание. Заключение срезов в оптически прозрачную среду.**

Для того чтобы ткани были хорошо различимы в проходящем свете и чтобы срез был защищен от возможного загрязнения и повреждения его окрашивают, просветляют и заключают.

В гистологической практике красители делят на три группы: основные, кислотные и нейтральные.

*Основной краситель* представляет собой красящее основание или его соль и окрашивает клеточные и тканевые структуры кислой природы, например хроматин ядра, содержащий ДНК, и ядрышко, содержащее РНК. Отсюда и термин **базофилия** (любящий основание) для обозначения тканевых компонентов, окрашиваемых основными красителями (тионин, гематоксилин, метиловый зеленый и др.).

*Кислотный краситель* - это красящая кислота или ее соль, в силу чего он окрашивает вещества основной природы, например гранулы эозинофильных лейкоцитов, цитоплазму некоторых клеток передней доли гипофиза и др. Отсюда и термин **оксифилия** (ацидофильный - любящий кислоту) для тканевых элементов, красящихся кислотными красителями. В эту группу веществ входят эозин, эритрозин, кислотный фуксин, конго красный и др.

*Нейтральный краситель* образуется при соединении водных растворов кислотного и основного красителей (соединение красящей кислоты с красящим основанием). К этой группе относятся судан III, метиленовый синий и др.

Термин **нейтрофилия** применим к результатам окрашивания обеими группами красителей.

Большинство гистологических красителей неспецифично, т.е. не раскрывает химическую природу тканевых компонентов. С их помощью можно изучать лишь морфологические особенности микроструктур.

Различают несколько типов гистологического окрашивания:

**Прогрессивное окрашивание** - это такой способ, при котором срезы находятся в красителе до тех пор, пока не достигнут требуемого уровня окрашиваемости.

**Регрессивное** - срезы вначале переокрашивают, а затем доводят до требуемой окраски путем отмывания в соответствующей жидкости, что позволяет более отчетливо выделить отдельные элементы тканей.

**Прямое окрашивание** - окрашивание объекта непосредственно в растворе красителя.

**Непрямое (протравка)** - срез окрашивают нужным красителем лишь после предварительной обработки специальными протравными красителями.

При **простом** окрашивании применяют один краситель. **Сложное** окрашивание предусматривает обработку препарата несколькими красителями (двумя и более) одновременно или последовательно (окраска гематоксилин-эозином, окрашивание по методу Ван-Гизона).

Все методы гистологического окрашивания можно разделить на две основные группы:

а) **обзорные** используемые для получения общего ориентировочного представления об изучаемом объекте (окрашиваются преимущественно ядра и цитоплазма клеток);

б) **специальные**, которые позволяют окрашивать именно те тканевые и клеточные элементы, которые интересуют исследователя (органеллы клетки, волокнистые структуры и т.д.).

Для того чтобы получить хорошие результаты при любом методе окраски гистологических препаратов, необходимо соблюдать определенные правила.

1. Красящие растворы должны быть чистыми, поэтому любой краситель необходимо перед употреблением отфильтровать, а водный раствор готовить только на дистиллированной воде.

2. Отдавать предпочтение: а) окрашиванию красителями низкой концентрации в течение длительного времени перед кратковременной окраской красителями высокой концентрации; б) применению регрессивных методов.

3. Тщательно выполнять все процедуры при подготовке среза к окраске и последующей его обработке.

### **Техника окрашивания**

**Предварительная подготовка.** Так как парафин не обладает достаточной прозрачностью и затрудняет процесс окрашивания (гистологические красители - это водные или спиртовые растворы, плохо проникающие в парафинированные ткани), его необходимо удалить из среза. Для этого срез подвергают депарафинированию - процессу, обратному тому, который осуществляют при подготовке объекта к заливке в парафин, т.е. срезы последовательно проводят через растворитель парафина, спирты нисходящей концентрации и помещают в воду. Практически это осуществляют так. Эtiquетируют стаканчики (, наливают в них соответствующие растворы и устанавливают в определенной последовательности, обеспечивающей проведение манипуляций по следующей схеме.

- Ксилол (бензол, толуол) - две смены по 2-4 мин
- Спирт 96% - две смены по 2-4 мин
- Спирт 70% - одна смена 2-4 мин
- Вода дистиллированная - 2 мин и больше

Примечание. В тех случаях, когда материал был фиксирован в жидкостях, содержащих дихлорид ртути, срезы необходимо подвергнуть дополнительной обработке, поместив их после 96° спирта в йодированный спирт. Время пребывания среза в растворе устанавливают опытным путем, наблюдая под микроскопом за растворением осадков дихлорида ртути. Так как йод вредно влияет на многие красители, его удаляют путем последующей обработки срезов (после 70% спирта) 0,25% раствором гипосульфата до исчезновения желтоватой окраски. Затем производят отмывание гипосульфата в дистиллированной воде.

Целлоидиновые срезы можно окрашивать без предварительного удаления целлоидина. В этих случаях срезы из 70% спирта (в котором их хранят или в который собирают в процессе резки) переносят в 50% спирт, а затем в дистиллированную воду. Если применяемый краситель окрашивает целлоидин, то последний удаляют, поместив срез в один из растворителей целлоидина (смесь из равных количеств абсолютного спирта с эфиром, ацетоном, метиловым спиртом). После растворения целлоидина срез обрабатывают так же, как при депарафинировании (спирты нисходящей концентрации - вода).

Желатиновые срезы освобождают от желатина, помещая в слегка подкисленную дистиллированную воду, подогретую до 37°C. Если блок подвергался дополнительному уплотнению в формалине, то удалить желатин невозможно, и это в ряде случаев может затруднить микроскопирование.

Замороженные срезы не нуждаются в предварительной обработке, так как обычно при резке их собирают в дистиллированную воду.

Предварительной обработке и последующей окраске можно подвергать как наклеенные на предметные стекла, так и свободноплавающие срезы.

Посуда должна быть четко этикетирована и расставлена в определенном порядке, обеспечивающем нужную последовательность работы.

Примечание. При переносе срезов из одного раствора в другой необходимо следить за тем, чтобы последующая порция жидкости как можно меньше загрязнялась предыдущей. Предметные стекла необходимо просушить фильтровальной бумагой.

**Проведение окрашивания.** При окраске водными красителями срезы переносят из дистиллированной воды, а при окраске спиртовыми - из спирта соответствующей концентрации непосредственно в красящий раствор (прямое окрашивание) или сначала в жидкость для протравки (непрямое окрашивание). Когда препарат приобретает нужную интенсивность окраски, его промывают в воде (или спирте) для удаления избытка красителя, а затем, если нужно, дифференцируют в соответствующей жидкости. Излишний краситель отмывают до тех пор, пока он не перестает переходить из среза в отмывающую жидкость.

Окрашивание срезов, наклеенных на стекла, можно проводить путем как помещения их в красящий раствор, так и накалывания красителя на срез.

### ***Просветление и заключение срезов***

Для того чтобы окрашенный препарат можно было исследовать в проходящем свете и возможно дольше хранить, он должен быть прозрачным и защищен от высыхания, загрязнения и повреждения.

Все эти условия обеспечиваются просветлением и заключением препарата в специальные среды, которые и сохраняют его прозрачность, окраску и структурную целостность.

Среды для заключения можно разделить на две основные группы:

- а) смешивающиеся с водой (глицерин, гуммиарабик, желатин);
- б) не смешивающиеся с водой (различные смолы).

Вещества первой группы являются одновременно просветляющими и не требуют обезвоживания препарата, тогда как перед заключением препарата в смолы, его необходимо тщательно обезвоживать и просветлять в карболксилоле (толуол, бензол) или оптических маслах (бергамотовое, гвоздичное и др.). Несмотря на то, что методика заключения препаратов в безводные среды (смолы) более сложная и повышает стоимость препарата, она применяется наиболее часто, так как имеет ряд важных преимуществ перед методикой заключения в водные среды. Основными из них являются: высокая степень прозрачности препарата, длительное сохранение его окраски и структур без изменений, удобство хранения. Наиболее распространенной смолой для заключения является бальзам (канадский или пихтовый).

#### **Заключение в смолы**

Обезвоживание (полное) препарата является обязательным предварительным условием его заключения в смолы.

Для этого находящийся в воде окрашенный препарат проводят через ряд спиртов возрастающей концентрации (60, 80, 96 и 100%).

Просветление препарата наступает уже в процессе обезвоживания, но, так как спирт не растворяет бальзам, его необходимо удалить. Для этого препарат помещают в один из растворителей бальзама, который, удаляя спирт, одновременно увеличивает прозрачность препарата. Чаще с этой целью применяют ксилол, который может быть заменен толуолом или бензолом.

При обработке целлоидиновых и не наклеенных желатиновых замороженных срезов следует 100% спирт заменять карбол-ксилолом, так как абсолютный спирт вызывает набухание первых и сморщивание вторых. Так как карбол-ксилол разрушает некоторые красители, пребывание в нем препаратов не должно превышать 3-4 мин, после чего необходимо тщательно промыть в двух порциях чистого ксилола.

Для того чтобы приготовить раствор карбол-ксилола, нужно расплавить в термостате (при 56°C) кристаллическую карболовую кислоту и затем смешать ее с ксилолом в соотношении 1:4, 1:6.

Следует помнить, что карбол-ксилол нарушает двойное лучепреломление веществ, находящихся в тканях, поэтому его нельзя использовать для поляризационных исследований.

Если необходимо избежать применения абсолютного спирта, помимо карбол-ксилола, можно использовать оптические масла (бергамотовое,

гвоздичное). После удаления излишков спирта накапывают масло, затем через 2-3 мин срез промокают фильтровальной (гладкой) бумагой и, повторив подобную процедуру несколько раз, проводят его через ксилол (бензол, толуол).

Если препарат недостаточно освобожден от воды, то при его погружении в ксилол появляется беловатое помутнение. В этом случае препарат необходимо вновь поместить в абсолютный спирт для окончательного обезвоживания.

### **Заключение срезов.**

Для обезвоженных и просветленных препаратов наиболее часто применяемой средой заключения является бальзам, представляющий собой прозрачную, желтоватого цвета древесную смолу. Бальзам обладает консервирующими свойствами, сохраняет прозрачность препарата и имеет показатель преломления, близкий к показателям преломления стекла.

Различают два вида бальзама - канадский и пихтовый. Способ приготовления их одинаков: кусок (или куски) затвердевшей смолы помещают в чистую сухую широкогорлую стеклянную банку и, залив ксилолом (или толуолом), ставят в термостат. Обычно приготавливают раствор жидкой консистенции, который фильтруют и оставляют в открытом сосуде (желательно в вытяжном шкафу). По мере испарения растворителя бальзам начинает загустевать. Когда консистенция его будет напоминать жидкий мед, раствор готов к употреблению.

Обычно бальзам имеет слабокислую реакцию. В тех случаях, когда кислая среда действует на окраску неблагоприятно, необходимо применять нейтральный бальзам, который получают путем добавления небольшого количества порошка карбоната калия или натрия. Хранят бальзам в специальных широкогорлых склянках, закрывающихся притертыми колпачками, шлиф которых смазывают тонким слоем вазелина. В центре пробки делают отверстие и вставляют в него стеклянную палочку, при помощи которой и извлекают бальзам.

**Методика.** Вынув стекло со срезом из ксилола, быстро вытирают тыльную сторону и, положив в горизонтальном положении на стол (или какую-либо плоскую подставку), наносят несколько капель бальзама. Затем берут подготовленное покровное стекло (чистым пинцетом или осторожно двумя пальцами за боковые края, чтобы не загрязнить поверхность), ставят его на предметное стекло рядом с препаратом под углом  $45^\circ$  и, как только бальзам растечется по краю покровного стекла, потихоньку опускают. При этом воздух постепенно вытесняется и бальзам покрывает препарат тонким, равномерным слоем. Покровные стекла нужно подготовить заранее. Помимо того, что они должны быть абсолютно чистыми, их следует рассортировать на толстые и тонкие. Если окрашиваемый препарат предполагают исследовать с применением иммерсионного объектива, то его нельзя заключать под толстое покровное стекло, так как фокусное расстояние объектива окажется меньшим, чем общая толщина заключенного препарата, и фокусировка не будет достигнута.

Если бальзам вытек из-под покровного стекла, его нужно тут же стереть тряпочкой, слегка смоченной в ксилоле. Заключенный препарат помещают на специальный планшет и кладут на покровное стекло груз на 24 ч для расправления. Если нужно сильно прижать (значительная неровность поверхности препарата), то применяют бельевые зажимы. Препарат должен находиться в горизонтальном положении не меньше 24 ч. После того как бальзам загустеет, препарату можно придавать любое положение.

Возможные погрешности при заключении:

а) весь препарат покрыт мельчайшими пылевидными капельками (недостаточное обезвоживание); необходимо сменить растворы, увеличить время обезвоживания;

б) под стеклом разнокалиберные подвижные пузырьки (при заключении попал воздух); если пузырьки расположены над препаратом и при легком надавливании препаровальной иглой на покровное стекло не исчезают, необходимо перезаключить препарат; для этого стекло с препаратом погружают в ксилол и держат до тех пор, пока покровное стекло сползет само или легко поддастся смещению препаровальной иглой;

в) препарат пересекают бесструктурные или зубчатые объемные волокна, на срезе расположены различные включения (загрязнение препарата в процессе проведения через растворы, загрязнен бальзам или же плохо очищено покровное стекло); фильтруют растворы, тщательно протирают покровные стекла.

**Хранение.**

Хранить гистологические препараты следует защищенными от пыли и света. Наиболее целесообразный способ - хранение в специальных коробках с зубчатыми рейками.

**Заключение в водные среды**

В тех случаях, когда по условиям обработки препарат не может соприкоснуться со спиртами, ксилолом и подобными растворами, его заключают в среду, содержащую воду (например, при окраске среза на жир проведение через спирты вызывает его растворение и вымывание). Как уже упоминалось, к таким средам относят глицерин, глицерин-желатин, гуммисироп Апати. Они обладают просветляющими свойствами.

**Методика.** Срез извлекают из воды, удаляют лишнюю влагу (обсушивая стекло вокруг препарата с помощью фильтровальной бумаги), накапывают несколько капель глицерина, теплого глицерин-желатина или гуммисиропа и накрывают покровным стеклом, как обычно. Гуммисироп и глицерин-желатин быстро загустевают, поэтому следует максимально сократить время между накапыванием раствора и покрытием препарата стеклом (густая среда плохо растекается, образуется толстый слой, что ухудшает оптические свойства препарата).

Так как нанесение глицерина на препарат, извлеченный непосредственно из воды, приводит к его сжатию, рекомендуется срезы из нежных тканей

помещать вначале в промежуточные смеси (глицерин и вода в соотношении 1:5, 1:3 или 1:1) и лишь затем заключать в чистый глицерин.

Следует помнить, что глицерин плохо сохраняет многие краски, в том числе и гематоксилин, поэтому употреблять его нужно по возможности реже.

Чаще применяют глицерин-желатин и гуммисироп.

Гуммисироп приготавливают, растворяя в 50 мл дистиллированной воды 50 г чистого гуммиарабика и 50 г сахара (при этом сосуд помещают в водяную баню). Для консервации смеси добавляют 0,5 г тимола.

Для приготовления глицерин-желатина берут 41 мл дистиллированной воды, засыпают 7 г желатина и оставляют для набухания в течение нескольких часов. Затем прибавляют 50 мл глицерина и 1 г концентрированной карболовой кислоты, нагревают в течение 10-15 мин, постоянно помешивая, после чего отфильтровывают через обычную или стеклянную вату. При комнатной температуре смесь представляет собой плотную массу, поэтому перед употреблением ее нужно подогреть в водной бане или термостате при 56°C.

После заключения препаратов в жидкие незастывающие среды (глицерин, гуммисироп и т.д.) необходимо производить их окантовку во избежание высыхания среды и сползания покровных стекол. Для этой цели используют различные лаки, парафин, целлоидин и др.

Препарат, подлежащий окантовке, тщательно вытирают, чтобы среда для заключения не выступала за края покровного стекла. После этого нагревают прямоугольно изогнутую металлическую проволоку (стеклянную палочку, глазной скальпель), отделяют кусочек массы и наносят по маленькой капле на углы покровного стекла, фиксируя его к предметному. Затем заделывают непрерывным кантом все стороны покровного стекла.

При окрашивании и заключении препарата необходимо придерживаться следующего правила: вначале окрасить и заключить один срез, проверить в микроскопе его качество и лишь после этого приступить к дальнейшей обработке остальных препаратов. Такой порядок позволяет своевременно устранить возможные погрешности (плохое окрашивание, недостаточное обезвоживание, загрязнение и др.) и обеспечить изготовление качественных препаратов.

#### Окрашивание гематоксилин-эозином

Этот метод самый распространенный в гистологической практике, так как благодаря удачному сочетанию красителей, относящихся к двум противоположным группам, позволяет получить общее представление о состоянии исследуемых органов и тканей.

Гематоксилин - природный краситель растительного происхождения, растворимый в воде, спирте и глицерине (поэтому срезы, окрашенные гематоксилином в глицерин не заключают).

В растворе гематоксилин обладает основными свойствами, благодаря чему хорошо выявляет структурные компоненты ядра, которые содержат нуклеиновые кислоты. Однако красящим свойством обладает не сам гематоксилин, а продукт его окисления - гематеин.

Эозин - искусственный краситель, растворимый в воде или спиртах, обладает кислотными свойствами, окрашивает цитоплазму клеток в розовый цвет.

*Приготовление гематоксилина.* В 1000 мл дистиллированной воды растворить 1г гематоксилина, добавить 0,2г йодата натрия ( $\text{Na}_3\text{IO}_3$ ), 50г калийных квасцов (химически чистых) и, непрерывно помешивая, дождаться их полного растворения (при этом жидкость приобретает фиолетово-синюю окраску). Затем добавляют 50г хлоралгидрата и 1г кристаллической лимонной кислоты, в результате чего раствор становится фиолетово-красным. В хорошо закрытом сосуде из химически чистого стекла краситель хранится длительное время.

Раствор не требует «созревания» и сразу может употребляться для окрашивания.

*Приготовление эозина.* 1г красителя растворяют в 1000 мл дистиллированной воды.

Методика окрашивания. Начинать следует с определения продолжительности, так как она находится в зависимости от способа фиксации, характера и свойств препарата и самих красителей и т.д. Для этого извлекают из дистиллированной воды три стекла со срезами (доведение препаратов до воды - см. предыдущий раздел), удаляют излишки влаги вокруг них (иначе краска растечется по всему стеклу и разбавится водой), кладут в горизонтальном положении и накапывают пипеткой раствор красителя до полного покрытия препарата. Через 2 мин сливают красящий раствор с одного из стекол и помещают его в дистиллированную воду (для отмывания излишков красителя). Два оставшихся стекла освобождают от гематоксилина через 4-6 мин соответственно. После этого, вытерев тыльную сторону стекла, препарат рассматривают при малом увеличении микроскопа (если нужно, то и при большом, накрыв препарат покровным стеклом).

Возможные варианты результатов:

а) ядра окрашены в светло-фиолетовый цвет без четкого различия микроструктур - препарат недокрашен;

б) ядра темно-фиолетовые (почти черные, но с красноватым оттенком), структурные элементы расплывчатые, цитоплазма тоже окрашена - препарат перекрашен;

в) ядра красно-фиолетовые с отчетливо выраженными ядрышком и хроматином, цитоплазма светлая, неокрашена - окраска нормальная.

Установив оптимальное время окрашивания гематоксилином, в течение 3-5 мин отмывают излишки красителя в дистиллированной воде и затем помещают препараты в водопроводную воду, где они находятся до приобретения синей окраски (10-14 мин) вследствие посинения ядер в слабощелочной среде (водопроводную воду можно заменить дистиллированной, слегка подщелочив ее аммиаком). После этого препарат вновь помещают на 3-5 мин в дистиллированную воду.

Помимо изложенного выше прогрессивного метода окраски ядер гематоксилином, существует регрессивный метод. Срез с перекрашенными

ядрами после промывания в дистиллированной воде помещают на 1-6 с в подкисленный 70° спирт (5-7 капель крепкой хлористоводородной кислоты на 100 мл спирта) и под контролем микроскопа следят за ослаблением окраски (ослабевают фиолетовый и усиливается красноватый тон ядер). Дальнейшая обработка обычная.

По окончании промывки окрашенного гематоксилином препарата в дистиллированной воде его вновь извлекают, удаляют излишнюю влагу и накапывают раствор эозина. Время окраски также подбирают опытным путем, варьируя экспозицию от 1 до 4-5 мин.

Возможные варианты:

а) окрашенная цитоплазма и внеклеточные образования имеют едва заметный розоватый или желтоватый оттенок - препарат недокрашен;

б) общий фон интенсивно красного цвета, микроструктуры видны нечетко, граница ядер расплывчата - препарат перекрашен;

в) общий фон умеренно розовато-желтого цвета, ядра четко контурируются - окраска удачная.

После того как окрашивание эозином закончено, краситель сливают обратно во флакон (как и гематоксилин, он может употребляться многократно), препарат ополаскивают в дистиллированной воде, проводят через спирты восходящей концентрации, карбол-ксилол, ксилол и заключают в бальзам.

Следует знать, что эозин легко вымывается в воде и спиртах низкой концентрации, поэтому проводить препарат через эти жидкости следует быстро, лишь окунув несколько раз, и только в 96% и 100% спирте можно держать 1-2 мин. Если препарат перекрашен эозином, то излишнюю окраску следует удалить, увеличив время промывания в дистиллированной воде и спиртах.

Для усиления красящих свойств эозина применяют подкисление раствора красителя уксусной кислотой (1 капля 3% уксусной кислоты на 100 мл красителя).

## **5.6. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6. Проведение гистохимических исследований.**

### **Выявление полисахаридов**

Полисахариды — высокомолекулярные сахара, встречаются в тканях организма как в чистом виде (гликоген), так и в соединении с другими веществами (мукополисахариды, мукопротеиды, гликопротеиды). Гликоген является резервом сахара в организме и содержится главным образом в печени и мышцах.

Полисахариды и их комплексы - весьма лабильные соединения, чутко реагирующие на разнообразные сдвиги обменных процессов в организме.

Вещества полисахаридной природы играют важную роль в обеспечении нормальных физиологических процессов и занимают ведущее место в развитии ряда патологических процессов, особенно связанных с заболеванием

соединительной ткани. Поэтому изучение динамики изменения содержания и распределения различных полисахаридных компонентов в организме имеет большое значение в исследовательской практике.

Реакция - шифф-йодная кислота (ШИК-реакция)

С помощью этой реакции можно выявить гликогены, мукопротеиды, гликопротеиды и гликолипиды.

*Рабочие растворы*

Реактив Шиффа (способ приготовления см. выше — с. 270).

Сернистая вода. К 200 мл дистиллированной воды добавить 4 мл концентрированной HCl. В 25 мл дистиллированной воды растворить 4г безводного сульфита натрия. Оба раствора соединить.

Раствор перйодата. Растворить 1г перйодата калия или 2,5г перйодата натрия в 100 мл дистиллированной воды.

Метод

1. Срезы толщиной 5-7 мкм депарафинировать и довести до воды.
2. Погрузить в раствор йодной кислоты на 5 мин или перйодата натрия либо калия на 20-30 мин.
3. Тщательно промыть в двух-трех порциях дистиллированной воды (по 3-5 мин), чтобы удалить остаток йодной кислоты.
4. Поместить в реактив Шиффа на 10-20 мин.
5. Обработать в трех порциях свежеприготовленной сернистой воды (по 1-2 мин).
6. Промыть в водопроводной воде в течение 10 мин, ополоснуть в дистиллированной.
7. Обезводить, просветлить и заключить в бальзам (если нужно окрасить ядра, то после шестого этапа производят докрасивание срезов гематоксилином).

Результат. Вещество полисахаридной природы окрашено в пурпурно- или лилово-красный цвет. Нейтральные мукополисахариды бывают обычно пурпурно-красными, гликоген - более темный.

Примечание. Обработку реактивом Шиффа следует проводить в хорошо закрывающихся биологических стаканчиках, обернутых в черную бумагу. Одну порцию реактива можно применять многократно (до появления красноватой окраски).

Если на срезах появляются грязно-коричневые пятна, это свидетельствует о том, что окисляющий раствор не был полностью промыт перед обработкой срезов реактивом Шиффа.

### Окрашивание жиров и липидов

**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°C) 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.

**Окраска шарлахом.** Красители: в смесь из 50 мл ацетона и 50 мл 70% спирта засыпают 0,2-0,3 г шарлаха. Хорошо закрывают и взбалтывают. Полученный раствор перед употреблением фильтруют.

Метод. 1. Замороженные срезы из свежей или фиксированной в формалине ткани помещают в 50% спирт на 2-4 мин.

2. Окрашивают в растворе красителя 2-3 мин.
  3. Быстро ополаскивают в 70% спирте.
  4. Промывают в воде.
  5. Подкрашивают ядра кислым гемалауном.
  6. Промывают в воде и заключают в глицерин или глицерин-желатин.
- Результат. Жировые вещества оранжево-красные, ядра - синие.

## **5.7. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7. Утилизация отработанного материала, дезинфекция использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.**

Чистота посуды является одним из важнейших условий. Поэтому всю посуду, идущую в употребление, предварительно тщательно моют в теплой мыльной воде специальными щетками, затем в холодной проточной воде и в заключение ополаскивают дистиллированной. В тех случаях, когда посуда должна быть особенно чистой (приготовление растворов, проведение гистохимических реакций), ее помещают в смесь следующего состава:

- Бихромат калия —  $K_2 Cr_2 O_7$  (насыщенный раствор) - 100 мл
- Вода горячая - 1000 мл
- Серная кислота (концентрированный раствор) - 100 мл

Для приготовления этой смеси сначала растворяют в горячей воде бихромат калия, затем раствор охлаждают и только после этого добавляют серную кислоту тонкой струйкой. В этом составе предметные стекла (и любую другую посуду) выдерживают 2—3 дня, а затем промывают в проточной воде в течение 1—2 дней. Приготовление раствора требует соблюдения техники безопасности: работа в резиновых перчатках и обязательно в вытяжном шкафу. При этом особое внимание следует обратить на то, чтобы добавлять не водный раствор к серной кислоте, что может привести к разбрызгиванию кислоты и ожогам, а кислоту к водному раствору. Хранить раствор с помещенными в него стеклами также рекомендуется в вытяжном шкафу.

Вымытую лабораторную посуду не вытирают, а помещают для сушки в сушильный шкаф, так как при вытирании на ней могут остаться волокна от ткани.

За инструментом необходим тщательный уход. После применения его следует сразу же мыть (если нужно, очищать) и насухо вытирать (или высушивать в сушильном шкафу).

Хранить инструменты следует в определенном месте. Это облегчает их нахождение и экономит рабочее время.

## **5.8. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8. Выявление элементов нервной системы и сосудистого русла.**

1. Техника импрегнации по методу Бильшовского-Грос.

Предварительной обработкой материала для выявления нейрофибрилл, по Бильшовскому, служит фиксация нейтральным формалином. Оптимальная ее продолжительность — 3 — 6 нед после помещения в формалин, однако материал, лежавший в формалине несколько лет, также дает удовлетворительные результаты, особенно после обработки пиридином. Проводят окраску срезов (импрегнация срезов) или кусочков (тотальная импрегнация). Для получения хороших результатов необходимы точное соблюдение прописей (инструменты только стеклянные!) и применение чистых реактивов.

### **Импрегнация срезов**

Материал фиксируют в растворе формалина (1:9) не менее 14 дней (максимальная толщина кусочков 1 см); промывают в проточной воде 2 — 3 ч, затем в дистиллированной воде 1—2 дня; нарезают на замораживающем микротоме срезы толщиной 5 — 10 мкм и собирают в дистиллированную воду. Хорошие срезы вылавливают и промывают 1 — 2 раза в дистиллированной воде, которую меняют 3 — 4 раза.

### **Импрегнация:**

- 1) срезы помещают в 2 % раствор нитрата серебра на 24 ч;
- 2) быстро (2 — 3 с) проводят через дистиллированную воду, сменяя стеклянные палочки;
- 3) помещают в свежеприготовленный раствор аммиачного серебра: к 10 мл 10 % раствора нитрата серебра добавляют 5 капель 40 % раствора гидроксида натрия — образуется коричнево-черный осадок окиси серебра. После этого при постоянном взбалтывании к раствору серебра по каплям добавляют раствор аммиака (молекулярная масса 0,875 — 0,910) до тех пор, пока от растворяющегося осадка останется лишь несколько крупинок. После каждой капли выжидают 10 — 20 с, прежде чем добавить следующую каплю. Необходимо избегать избытка аммиака. Раствор разводят до 20 мл дистиллированной водой. В раствор аммиачного серебра срезы помещают на 10 — 20 мин, в нем они должны приобрести желтоватый оттенок;
- 4) быстро проводят через 2 — 3 порции дистиллированной воды;

5) восстанавливают в растворе формалина (1:4), не содержащем кислоты в течение 10 мин, — срезы быстро окрашиваются в темно-серый цвет;

6) промывают в воде 15 мин;

7) золотят в разбавленном растворе трихлорида золота (3 — 5 капель 1 % раствора желтого трихлорида золота на 10 мл дистиллированной воды) до тех пор, пока коричневый тон не перейдет в серый или серо-фиолетовый;

8) фиксируют 1—2 мин в 5 % растворе тиосульфата натрия;

9) тщательно промывают в обычной воде (1—2 ч); проводят через спирты, карбол-ксилол, ксилол (не дольше, чем нужно) и заключают в бальзам.

На хорошо импрегнированных препаратах нейрофибриллы и перицеллюлярные сетчатые структуры ганглиозных клеток черного цвета выделяются на светлом фоне, так же отчетливо видны тончайшие осевые цилиндры.

К восстанавливающему 4 % раствору формалина можно добавить 1 % цитрат натрия в соотношении 1:9. В этом случае картина, получающаяся в результате серебрения, очень равномерная и более контрастная.

#### **Метод серебрения с предварительной обработкой пиридином**

В тех случаях, когда материал предназначается главным образом для выявления осевых цилиндров, а не внутриклеточных нейрофибрилл, М. Бильшовский рекомендует предварительно обработать его пиридином (благодаря этому сильно подавляется подкраска глии и соединительной ткани). Фиксацию и предварительную подготовку материала проводят по методу Бильшовского. Замороженные срезы промывают в дистиллированной воде 1 — 2 ч и переносят в неразведенный пиридин на 24— 48 ч. Затем срезы тщательно освобождают от пиридина, промывая их в часто сменяемой дистиллированной воде до тех пор, пока не исчезнет специфический запах пиридина. После этого переносят в 2 % раствор нитрата серебра на 24 ч и далее обрабатывают по методу Бильшовского.

#### **Тотальная импрегнация**

Импрегнацию целого кусочка проводят с предварительной обработкой пиридином или без нее. В последнем случае кусочки ткани размером не более 1 см<sup>3</sup> фиксируют в формалине и без промывания переносят в 2 % раствор нитрата серебра на 1 — 8 дней (в зависимости от величины). Затем переключают на 0,5 — 6 ч в раствор аммиачного серебра, быстро проводят через дистиллированную воду и помещают в 20 % раствор формалина на 12 —24 ч. После этого материал как можно быстрее заливают в парафин.

Более надежной является тотальная импрегнация с пиридином по Бильшовскому.

1. Органы, фиксированные не менее 1 нед в нейтральном формалине (от 1:4 до 1:9), разрезают на кусочки толщиной не более 0,5 см и на 3 — 4 дня помещают в чистый неразведенный пиридин при комнатной температуре.

2. Промывают 12 — 24 ч в проточной воде и столько же в часто сменяемой дистиллированной воде.
3. Пропитывают в 3 % растворе нитрата серебра при 36 °С 3 — 5 дней.
4. Быстро ополаскивают в дистиллированной воде.
5. Помещают на 24 ч в раствор аммиачного серебра (готовят так же, как для импрегнации срезов, но доливают дистиллированной водой до 100 мл).
6. Промывают в часто сменяемой воде (по Бильшовскому до 1 ч в зависимости от толщины блока, по Буке, 2 ч).
7. Восстанавливают в нейтральном формалине (1:9) 10 — 12 ч.
8. Ополаскивают в дистиллированной воде, быстро проводят через спирты, заливают в парафин; золочение и фиксацию проводят на срезах.

При тотальной импрегнации с применением пиридина можно использовать материал, находившийся в формалине в течение нескольких лет. При этом методе глия и соединительная ткань обычно отстают на задний план или выделяются благодаря иному тону окраски. Фибриллярные структуры ганглиозных клеток выявляются менее четко, чем при использовании оригинального метода, моторные и чувствительные концевые образования нервов, наоборот, видны отчетливо.

Нередко импрегнация протекает хорошо не во всем кусочке, а лишь в его определенных зонах. Более благоприятные результаты наблюдаются в эмбриональных тканях, которые легче пропитываются.

М. Бильшовский рекомендует использовать для восстановления серебра не формалин, а смесь, состоящую из 75 мл 30 % раствора фруктозы, 75 мл 10 % раствора сегнетовой соли, 20 мл 10 % раствора карбоната калия и 5 мл чистого формалина. Импрегнированные блоки помещают в эту смесь на 24 ч при 50 °С. Затем следуют промывание в дистиллированной воде, обезвоживание и заливка.

Смесь может быть применена и для восстановления импрегнированных срезов. В этом случае срезы после пропитывания в растворе аммиачного серебра быстро ополаскивают и переносят на 1 — 2 мин в указанный раствор, подогретый до 50 °С. Затем следуют промывание, золочение и т.п.

С помощью восстанавливающей смеси по Бильшовскому особенно хорошо выявляются перичеселлюлярные концевые образования в ЦНС.

## **Лабораторная работа 9 Выявление структурных элементов костной ткани.**

Прежде чем приступить к декальцинации, кость, как и любую ткань, необходимо подвергнуть фиксации. Выбор фиксатора зависит от целей и характера исследования. Так, для озорных препаратов и выявления фибриллярных компонентов костной ткани применяют чистый формалин (15-20% Раствор), в то время как для цитологических исследований предпочтительней сложные фиксаторы, также содержащие формалин, ибо он уменьшает степень набухания волокнистых структур, при последующей

обработке ткани (например, фиксатор Штиве: насыщенный водный раствор дихлорида ртути - 76мл, формалин 20 мл, ледяная уксусная кислота - 4 мл)

Для фиксации следует выпиливать лобзиком небольшие кусочки кости (толщиной 0.5-1 см), так как из-за высокой плотности ткани фиксатор проникает медленно. Срок фиксации зависит от толщины кусочка (не менее 48 часов)

При окончании фиксации объект тщательно промывают в проточной водопроводной воде или спирте (например, после сложных фиксаторов, содержащих дихлорид ртути), так как при последующей обработке кислотами могут образоваться труднорастворимые осадки. После этого с целью обезжиривания препарата проводят через ряд спиртов повышающейся концентрации (50, 70 и 96%), а затем доводят до воды через спирты нисходящей концентрации.

Декальцинация достигается обработкой костной ткани с помощью декальцинирующих жидкостей, обладающих свойствами растворять неорганические соли, не повреждая структурные элементы кости.

При декальцинации следует придерживаться следующих основных правил:

1. Применять большое количество декальцинирующей жидкости и менять ее ежедневно (объем жидкости должен превышать объем объекта не менее чем в 50-70 раз);

2. Декальцинируемый объект помещать в верхнем слое жидкости, чтобы обеспечить опускание на дно растворяющихся солей (подвешивание кусочков на нитке или стеклянном сите);

3. Проводить декальцинацию до полного удаления минеральных солей (но не передерживать материал в жидкостях, так как это приводит к набуханию фибрилл и ухудшению окрашиваемости структур)

Декальцинация считается полной тогда, когда объект становится мягким и режется ножом легко и без хруста. Ход процесса можно проверить по степени погружения в объект препаровальной иглы. Сгибать препарат и надавливать на него не рекомендуется, так как это приводит к повреждению тонких структур кости.

Декальцинация в в одном растворе АЗОТНОЙ КИСЛОТЫ (5-7,5 %) ЯВЛЯЕТСЯ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫМ СПОСОБОМ. Для приготовления рабочего раствора в мерную колбу наливают 5-7,5 мл химически чистой концентрированной азотной кислоты (плотность 1,40) и доливают до 100 мл дистиллированной воды (раствор можно готовить в прок в больших количествах, рассчитав общую потребность). Применять более низкие и более высокие концентрации растворов для декальцинации кости не рекомендуется, так как первые вызывают набухание, а вторые - повреждение клеточных структур. Более высокие концентрации (до 10%) используют лишь для декальцинации зубов.

Налив нужное количество жидкости в подходящий стеклянный сосуд, в нее подвешивают подготовленный к декальцинации кусочек кости. Раствор меняют ежедневно до наступления полной декальцинации. Срок

декальцинации зависит от свойств объекта (плотность, величина) и концентрация азотной кислоты. Средняя продолжительность декальцинации небольших кусочков компактной костной ткани 10-12 суток.

По окончании декальцинации для устранения набухания волокнистых структур препарат подвешивают на 24 часа в 5% раствор СУЛЬФАТА НАТРИЯ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  или ЛИТИЯ  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  ( в случае отсутствия таких солей кость следует поместить в 96% спирт) и лишь после этого тщательно промывают в течение 1-2 суток в проточной водопроводной воде.

Можно сократить срок получения декальцинированной кости, поместив выпиленный кусочек непосредственно в 5% раствор трихлоруксусной кислоты, содержащий 10-20% формалина. Эта смесь одновременно фиксирует и декальцинирует. Маленькие кусочек средней плотности можно декальцинировать за 3-5 дней. После декальцинации после декальцинации промывают в спирте (НИВКОЕМ СЛУЧАЕ НЕ В ВОДЕ!!!)

Существует ряд других способов декальцинации, но все они основаны на одном и том же принципе и требуют соблюдение изложенных выше общих правил.

После декальцинации костную ткань можно резать на замораживающем микротоме, а также заливать в целлоидин или целлоидин - парафин обычным путем. Заливка в парафин не рекомендуется, так как он плохо пропитывает декальцинированную кость.

#### ОКРАШИВАНИЕ

Наиболее распространенный метод окрашивания срезов декальцинированной костной ткани –по Шморлю (ТИОНИНПИКРИНОВАЯ КИСЛОТА).

Рабочие растворы:

А- насыщенный раствор тионина в 50% спирте.

Б-1% водный раствор фенола.

В- насыщенный раствор пикриновой кислоты.

Перед употреблением сливают 1 часть раствора (А) с 10 частями раствора (Б). Находящееся в воде срезы переносят на 10 мин в полученную смесь, после чего споласкивают в дистиллированной воде и помещают на 30-60 с в насыщенный раствор пикриновой кислоты. Затем срезы вновь споласкивают в дистиллированной воде и дифференцируют в 70% спирте до получения темно-красной окраски. После этого их переносят в 96% спирт, в котором продолжают дифференцировку (под контролем микроскопа до тех пор, пока общий фон среза не приобретет коричневый (или болотный) цвет, а костные клетки и их отростки - красный. Окрашенные срезы затем проводят через 96% и абсолютный спирт, карбол - ксилол, ксилол и заключают в полистирол.

Если срезы плохо окрашивается из-за длительной декальцинации в азотной кислоте, его нужно предварительно поместить на 2-3 ч в 0,5% аммиачную воду, после чего хорошо промыть, в дистиллированной воде и затем окрасить.

## 5.10. Лабораторная работа 10 Общий анализ крови. Морфология клеток крови.

### Приготовление и окрашивание мазка крови

Для морфологического исследования клеток крови и подсчета лейкоцитарной формулы готовят мазок крови. Мазок крови должен отвечать следующим требованиям:

1) начинаться на 1 см от начала предметного стекла и кончаться на расстоянии 2-3 см от его противоположного края, общая длина мазка должна охватывать  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{3}{4}$  стекла;

2) быть равномерной толщины, а не волнообразным, хороший мазок толще всего вначале, затем постепенно истончается и заканчивается в виде следа («вид щеточки»);

3) слой крови не должен достигать краев стекла, между ним и краем стекла всегда должно быть несколько миллиметров свободного пространства.

*Техника приготовления мазка.* Предметные стекла, на которых будут делаться мазки крови, должны быть хорошо обезжирены и промыты. Для этой цели их помещают в раствор хромпика (смесь  $K_2Cr_2O_7$  + крепкая  $H_2SO_4$ ) на 24 ч. Затем стекла промывают под проточной водой в течение 24 ч, протирают насухо и кладут в банку со смесью спирт - эфир. Перед употреблением их сушат. К капле крови прикасаются предметным стеклом так, чтобы оно не касалось пальца. Капля крови переходит на стекло. Капля должна быть диаметром 2-5 мм. Предметное стекло берут в левую руку большим, указательным и средним пальцами так, чтобы капля крови была сверху. Шлифованное стекло, которым будут делать мазок, ставят под углом 30-45° на расстоянии 1-2 мм перед каплей, держа его большим и указательным пальцами правой руки. Шлифованное стекло сдвигают назад так, чтобы оно коснулось капли крови и капля растеклась в углу между шлифованным и предметным стеклом (движение назад помогает также убрать лишнюю кровь, если капля была слишком большой). Затем быстрым движением руки вперед делают мазок. Нужно, чтобы при приготовлении мазка большой и указательный пальцы правой руки скользили по краям предметного стекла и создавали необходимую опору для равномерного наложения слоя крови. Шлифованное стекло должно быть уже, чем предметное, чтобы края предметного стекла были свободны от мазка.

*Окрашивание мазков крови.* Мазки крови подсушивают, затем фиксируют с помощью метилового спирта (3-5 мин) или абсолютного спирта (100%) (10-15 мин) или ацетона (5 мин). Наилучшие результаты дает все же фиксация мазков метиловым спиртом. Фиксирующие жидкости денатурируют белки клетки при сохранении их прижизненной структуры, а также закрепляют мазки на стеклах. Нефиксированные мазки легко смываются.

Фиксирующие жидкости наливают в достаточном количестве на стекла или стекла с мазками погружают в банку с фиксатором. После фиксации и высушивания мазков приступают к их окрашиванию. Обычно применяют метод Романовского-Гимзы. Краситель состоит из щелочной (азур II) и кислой

(эозин) частей. Азур II окрашивает структуры клеток в ярко-синий цвет, а эозин в розово-красный.

Рабочий раствор красителя получают разведением готового раствора дистиллированной водой (1—2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды). Для хорошего окрашивания мазка имеют значение качество красителя, реакция и температура воды. Очень важно, чтобы дистиллированная вода, в которой растворяют краситель, имела нейтральную реакцию. Если реакция кислая, то слабым действием щелочного элемента красителя белые кровяные элементы окрашиваются плохо, а препарат становится красным. Если вода имеет щелочную реакцию, то слабеет действие кислого элемента краски, лейкоциты окрашиваются слишком интенсивно и препарат делается синим. Реакцию воды проверяют посредством гематоксилиновой пробы. В 4-5 мл воды бросают крупинку гематоксилина. Если вода имеет щелочную реакцию, то окрасится ранее 3-й минуты. Если окрашивание наблюдается через 5 мин или совсем не происходит, то вода имеет кислую реакцию. Если же вода окрашивается через 1-4 мин в розово-фиолетовый цвет, то она нейтральна и годна к употреблению. При кислой реакции воды в нее прибавляют по каплям 1% раствор карбоната натрия, пока гематоксилиновая проба не станет характерной для нейтральной воды. При щелочной реакции добавляют по каплям 1% раствор уксусной кислоты. Для того чтобы правильно оценить результаты пробы, стаканчик с водой надо ставить на лист белой бумаги.

Окраску мазков производят по методу Романовского—Гимзы следующим образом. Перед окраской нужно предварительно проверить качество красителей, окрасив и просмотрев несколько мазков для того чтобы установить время, лучшее для окраски. Рабочий раствор краски готовят непосредственно перед окраской. Препарат помещают мазком вниз на 2 стеклянные (деревянные) палочки, положенные на дно чашки Петри. Краску подливают под препарат. Окрашивают 20-40 минут. Затем мазок промывают под струей воды, сушат и микроскопируют.

При окраске мазков крови по методу Романовского-Гимзы эритроциты окрашиваются в бледно-розовый цвет, ядра клеток - в сине-фиолетовый, гранулы эозинофилов - в ярко-красный, базофилов - в синий, цитоплазма лимфоцитов и моноцитов - в голубой цвет.

### **5.11. Лабораторная работа 11 Методы исследования живых клеток и тканей.**

*Материалы и оборудование для выполнения лабораторной работы 5.*

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (Евроген, MB001) (если не выполнялась работа 4)
- Среда для культивирования бактерий LB , жидкая и агаризованная на чашках Петри
- Ампициллин
- Буфер для озвучивания (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,5-8; 300 мМ NaCl)
- Хелатный сорбент для очистки белков с His-мишенью (например, Protino

Ni-IDA или Ni-ТЕД (Macherey-Nagel), NiNTA-agarose (Qiagen))

- Раствор ЭДТА для элюции белка, 100 мМ, рН 8,0
- Оборудование для детекции флуоресценции (трансиллюминатор (295 нм) или любая УФ-лампа)
- Вортекс (желательно)
- Термостат для чашек Петри (+37°C)
- Настольная центрифуга
- Ультразвуковой гомогенизатор
- Пробирки (1,5 или 0,2 мл)
- Штатив для пробирок
- Стерильные наконечники для пипеток
- Стерильные культуральные пробирки (10-15 мл), стеклянные или полипропиленовые
- Автоматические пипетки на 10-20, 200 и 1000 мкл
- Перчатки

### *Ход работы*

I Если данная задача выполняется без выполнения задачи 4, предварительно проведите трансформацию бактерий контрольной плазмидой из набора для практикума *Clavularia FP cloning set* как описано в п.п. 21 – 32 (работа 4).

1) Пересейте остаток суспензии (п. 34 раздела IV.5) на отдельные чашки Петри. Равномерно распределите весь объем суспензии по поверхности агара и тщательно разотрите шпателем.

2) Открытые чашки Петри подсушите в течение 3-5 мин рядом с пламенем горелки, после чего поставьте вверх дном в термостат на +37°C на ночь.

3) Через 18-20 ч перенесите чашки в холодильник на +4°C (разместив вверх дном) и оставьте на 2-3 дня для созревания белка.

4) Достаньте чашки из холодильника. Убедитесь, что выросшая биомасса имеет флуоресценцию. Для этого поместите чашку под источник УФ на 20-30 сек.

Наличие флуоресценции в биомассе является доказательством присутствия рекомбинантного белка.

5) Соскребите бактерии с поверхности агара одноразовым пластиковым ножом или расплюснутым носиком для пипетки.

6) Ресуспендируйте биомассу в 1 мл буфера для озвучивания и поместите пробирку в лед.

7) Разружьте клетки с применением ультразвука. Подберите такой режим озвучивания, чтобы не образовывалась пена (например, 3-5 импульсов средней мощности по 20-30 сек с перерывами по 30-40 сек, во время озвучивания пробирку охлаждать во льду). Вместо обработки ультразвуком можно провести гипотонический шок: ресуспендировать клетки в 10 мМ Трис-НСl, рН 7-8, и подвергнуть 5-10 циклам замораживания-размораживания). Эффективность выделения белка при этом существенно снижается.

8) Клеточный дебрис осадите центрифугированием в течение 20 мин на максимальной скорости на настольной центрифуге. Аккуратно отберите надосадочную жидкость и перенесите ее в новую пробирку.

9) Проведите очистку мини-препарата рекомбинантного белка с помощью хелатного сорбента согласно инструкции производителя. Элюируйте белок 50 мкл 100 мМ раствора ЭДТА. Препарат белка можно хранить при +4°C в течение недели и при -20°C длительное время.

10) Поместите пробирку с белковым препаратом под УФ-трансиллюминатор или УФ-лампу для обнаружения флуоресценции. В качестве дополнительных задач рекомендуется снять спектры флуоресценции белка на спектрофлуориметре и провести анализ денатурированного и неденатурированного белка с помощью гельэлектрофореза в ПААГ.

*Итоги выполнения лабораторной работы :*

Продемонстрировано наличие флуоресценции в биомассе. Выделен рекомбинантный белок. Результаты запротоколированы в лабораторном журнале.

#### **5.14. Лабораторная работа 14. Методы лабораторной диагностики гельминтозов.**

##### **Качественные методы гельминтоооскопии**

Просмотр препаратов (исследование) производят при малом увеличении микроскопа: объектив X8 – X10, окуляр X7-X10. Только в сомнительных случаях используют объектив - X40. При просмотре яиц с прозрачной оболочкой необходимо затемнить поле зрения микроскопа.

##### **Метод нативного мазка**

1. Крупинку фекалий (30-40 мг) растереть на предметном стекле в капле 50% раствора глицерина (можно в воде или в физиологическом растворе) до равномерной взвеси.

2. Покрывать покровным стеклом.

3. Исследовать.

На одном предметном стекле готовят две капли взвеси фекалий на расстоянии 3-4 см друг от друга, используя разные палочки для фекалий.

**Этот метод мало эффективен, особенно при слабой инвазии.** Метод используют как дополнительный к другим методам.

##### **Метод толстого мазка (метод Като и Миура)**

1. Квадратные пластинки целлофана (22x30 мм) выдержать в феноле, затем в смеси дистиллированной воды (100 мл) + глицерин (100 мл) + 3% малахит зеленый (1 мл) 24 часа. ГЛИЦЕРИН ОБЕЗВОЖИВАЕТ ПЛАСТИНКУ ЦЕЛЛОФАНА, ФЕНОЛ ОБЕЗЖИРИВАЕТ, просветляет препарат. МАЛАХИТ ОКРАШИВАЕТ В ЗЕЛЕНый ЦВЕТ, что улучшает их наблюдение в нативном препарате.

2. Крупинку фекалий (100 мг) намазать на стеклянную пластинку (25x35 мм)- препарат мутный, яйца трудно различать, т.к. они окрашены пигментом фекалий в желто-коричневый цвет.

3. Накрывать влажной целлофановой пластинкой (препарат обезвоживается, обезжиривается и просветляется, яйца окрашиваются в зеленоватый цвет. Препарат легче изучать).

4. С помощью предметного стекла притереть целлофан.

5. Препарат выдержать в течение часа при комнатной температуре.

6. Затем выдержать 30 минут в сушильном шкафу при 40<sup>0</sup>С.

7. Исследовать.

С помощью этого метода можно исследовать большой объём фекалий в препарате. Наиболее точный метод.

Не используется при исследовании яиц карликового цепня и анкилостом т.к. они быстро разрушаются.

### **Метод Фюллеборна — всплывания (флотации)**

Этот метод основан на свойстве яиц гельминтов - всплывать в насыщенных солевых растворах (350 г поваренной соли + 1 литр кипяченой воды = фильтровать через марлю). **Используется раствор имеющий плотность большую, чем яйца гельминтов(яйца легче).**

1. Одну часть фекалий смешать с 20-ю частями насыщенного раствора хлорида натрия (NaCl).

Удельный вес раствора составляет 1,18. Раствор добавлять постепенно.

2. Удалить крупные частицы фекалий.

3. Смесь оставить отстаиваться 40-60 минут.

Яйца гельминтов, имеющих меньший удельный вес, чем раствор всплывут на поверхность.

4. С поверхности проволочной петлей (диаметр – 1 см) снять несколько капель и перенести на предметное стекло.

5. Покрывать покровным стеклом и исследовать.

С помощью этого метода нельзя обнаружить яйца Trematoda и неоплодотворенные яйца Ascaris. Яйца этих гельминтов и яйца Trichuris trichiura можно обнаружить в осадке.

### **Метод Калантарян (видоизменённый метод флотации - всплывания)**

Этот метод основан на свойстве яиц гельминтов всплывать в насыщенных растворах (NaNO<sub>3</sub> + вода ). Удельный вес раствора – 1,4, выше чем имеет раствор поваренной соли.

1. Одну часть фекалий смешать с 20-ю частями раствора.

2. Прокипятить.

Через 10-15 минут яйца всплывут на поверхность.

3. С поверхности смеси снять проволочной петлей (диаметр – 1 см) несколько капель и перенести на предметное стекло.

4. Покрывать покровным стеклом и исследовать.

Исследование осадка при этом методе не требуется (яйца Trematoda всплывают).

Можно использовать калиевую соль, аммиачную селитру, смесь солей.

### **5.15. Лабораторная работа 15. Методы анализа изображения клеточных и тканевых структур.**

1. Ручная морфометрия.
2. Автоматические системы обработки и анализа изображений (на примере системы «Мекос – С1»).

## **6. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЗАЧЕТУ**

1. Организация лаборатории световой микроскопии. Общие принципы и разновидности световой микроскопии.
2. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Вскрытие лабораторных животных.
3. Требования к взятию и этикетированию материала.
4. Общие принципы фиксации биологического материала.
5. Методика обезвоживания биологического материала. Приготовление абсолютного спирта.
6. Методика пропитывания заливочными средами. Заливка в парафин.
7. Виды микротомов. Правила работы на микротоме.
8. Правила резания на микротоме.
9. Методика приготовления срезов из парафиновых блоков. Возможные погрешности при изготовлении парафиновых срезов.
10. Классификация способов окрашивания. Виды красителей.
11. Техника окрашивания: предварительная подготовка, проведение окрашивания, просветление и заключение срезов.
12. Методика окрашивания гематоксилин-эозином. Приготовление растворов гематоксилина и эозина.
13. Выбор методов исследования в зависимости от цели и поставленных задач.
14. Техника импрегнации по методу Бильшовского-Грос.
15. Техника импрегнации по методу В.В. Куприянова.
16. Выявление двигательных нервных окончаний в мышечной ткани методом импрегнации.
17. Особенности обработки и окрашивания костной ткани.
18. Фиксация и способы декальцинации костной ткани.
19. Техника приготовления мазка.
20. Окраска мазка крови.
21. Анализ содержания форменных элементов крови и их морфологическая характеристика в норме.
22. Особенности лейкоцитарной формулы при различных патологических состояниях организма.

23. Прижизненные исследования клеток в организме.
24. Витальное и суправитальное окрашивание.
25. Исследование живых клеток и тканей в культуре.
26. Понятие о клеточных гибридах и гибридомах.
27. Технология создания рекомбинантных ДНК.
28. Цито- и гистохимические методы.
29. Метод радиоавтографии.
30. Метод иммунофлюоресцентного анализа.
31. Применение антител.
32. Понятие о цитоспектрофотометрии как методе количественного изучения внутриклеточных веществ по их абсорбционным спектрам.
33. Цитоспектрофлюориметрия – метод количественного изучения внутриклеточных веществ по спектрам их флюоресценции или по интенсивности флюоресценции на одной заранее выбранной волне.
34. Понятие о интерферометрии.
35. Общая характеристика методов лабораторной диагностики гельминтозов.
36. Метод обогащения Фюллеборна.
37. Метод Е.В. Калантарян.
38. Количественные методы диагностики: овометрия, определение числа яиц гельминтов в капрологическом материале.
39. Диагностика фасциолеза, тениоза, тениаринхоза, дикроцелиоза, лямблиоза, дефиллоботриоза, энтеробиоза, аскаридоза по данным капрологического анализа.
40. Ручная морфометрия.
41. Автоматические системы обработки и анализа изображений (на примере системы «Мекос – С1»).
42. Подготовка микроскопа к работе.
43. Принадлежности для измерения и счета.
44. Морфометрические исследования экспериментального материала.
45. Методы статистической обработки результатов исследования.

## 7. ТЕСТЫ (ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ) ДЛЯ ТЕКУЩЕГО КОНТРОЛЯ И КОНТРОЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ОБУЧАЮЩИХСЯ

Индекс компетенции	№ задания	Тест
ОПК-2 (знать)	1.	ПОСЛЕ ФИКСАЦИИ МАТЕРИАЛ ПРОМЫВАЮТ: 1. Спиртом 2. Водой 3. Формалином
ОПК-2 (знать)	2.	СИЛЬНЕЙШИМ ЯДОМ ИЗ СЛОЖНЫХ ФИКСАТОРОВ ЯВЛЯЕТСЯ: 1. Метиловый спирт 2. Формул 3. Этиловый спирт
ОПК-2 (знать)	3.	СЛОЖНОЕ ОКРАШИВАНИЕ ПРЕДУСМАТРИВАЕТ: 1. 1 краситель 2. 2 и более 3. Не имеет значения
ОПК-2 (знать)	4.	НАКЛЕЙКА БЛОКОВ ПРОИЗВОДЯТ НА: 1. Пластмассовые блоки 2. Деревянные 3. Оба варианта верны
ОПК-2 (знать)	5.	СПИРТ, НЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ПРИ ФИКСАЦИИ: 1. 96% 2. 65% 3. 5%
ОПК-2 (знать)	6.	СОХРАНЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННОЙ СТРУКТУРЫ: 1. Промывка 2. Фиксация 3. Парафинирование
ОПК-2 (знать)	7.	СЕКЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ: 1. Прижизненное взятие 2. От трупа 3. Оба варианта верны
ОПК-2 (знать)	8.	ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ЗАДЕРЖКА ПОСМЕРТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТКАНЯХ ПРОИЗВОДИТСЯ ПУТЁМ: 1. Фиксации 2. Этилирования 3. Парафинирования
ОПК-2 (знать)	9.	ПРИ ЭТИКИРОВАНИИ НАДПИСЬ НА БИРКЕ СЛЕДУЕТ ДЕЛАТЬ: 1. Только простым карандашом 2. Только автоматической ручкой 3. Не имеет значения
ОПК-2 (знать)	10.	ПРОИЗВОДИТЬ ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ СРЕЗ СЛЕДУЕТ ТАКИМ ОБРАЗОМ, ЧТОБЫ: 1. В него попала зона перехода очага поражения в нормальный участок 2. Без разницы, с любого пораженного очага 3. Оба варианта верны

ОПК-2 (знать)	11.	ПРИЖИЗНЕННЫЙ ЗАБОР КУСОЧКА ТКАНИ ОТ БОЛЬНОГО ОРГАНА: 1. Секционный материал 2. Биопсия 3. Материал от животного
ОПК-2 (знать)	12.	ВСКРЫТИЕ ТРУПОВ ЛЮДЕЙ РАЗРЕШЕНО НЕ РАНЕЕ ЧЕМ ЧЕРЕЗ: 1. 12 ч после констатации смерти врачом 2. 6 ч 3. 24ч
ОПК-2 (знать)	13.	ПАРАФИНИРОВАНИЕ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ С ДОБАВЛЕНИЕМ: 1. Сульфата меди 2. Хлороформа 3. Дистиллированной воды
ОПК-2 (знать)	14.	ФИКСАТОР, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЙ ОТНЯТИЕ У ТКАНЕЙ ВОДЫ И КОАГУЛЯЦИЮ БЕЛКОВ: 1. Этиловый спирт 2. Метиловый спирт 3. Ацетон
ОПК-2 (знать)	15.	ОКРАШИВАНИЕ, ПРЕДУСМАТРИВАЮЩЕЕ ОБРАБОТКУ ПРЕПАРАТА НЕСКОЛЬКИМИ КРАСИТЕЛЯМИ (2-Е И БОЛЬШЕ) 1. Простые 2. Сложное 3. Прогрессивное
ОПК-2 (знать)	16.	ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ АБСОЛЮТНОГО СПИРТА НЕОБХОДИМО ИЗВЛЕЧЬ: 1. H <sub>2</sub> O 2. Сульфат меди 3. Уксусная кислота
ОПК-2 (знать)	17.	СЛЕДУЮЩИЙ ЭТАП ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО СРЕЗА ПОСЛЕ ОБЕЗВОЖИВАНИЯ: 1. Парафинирование 2. Промывка 3. Фиксация
ОПК-2 (знать)	18.	ОКРАШИВАНИЕ ОБЪЕКТА НЕПОСРЕДСТВЕННО В РАСТВОРЕ КРАСИТЕЛЯ: 1. Прогрессивное 2. Сложное 3. Прямое
ОПК-2 (знать)	19.	КРАСИТЕЛЬ, ОБРАЗУЮЩИЙСЯ ПРИ СОЕДИНЕНИИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ КИСЛОТНОГО И ОСНОВНОГО КРАСИТЕЛЕЙ: 1. Нейтральный 2. Кислотный 3. Сложный
ОПК-2 (знать)	20.	СРОК ФИКСАЦИИ ФОРМАЛИНОМ: 1. 4-6ч 2. 1-4ч 3. 24-48ч
ОПК-2 (знать)	21.	ФИКСАТОР ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЯДРА: 1. Шабаташа

		<ol style="list-style-type: none"> <li>2. Корица</li> <li>3. Формалин</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	22.	<p>ВРЕМЯ, НЕОБХОДИМОЕ НА ПРОМЫВКУ (В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МАТЕРИАЛА)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. От нескольких часов до часа;</li> <li>2. 20-25ч;</li> <li>3. 15-25ч;</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	23.	<p>ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОПИТКИ НЕОБХОДИМО :</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Обезвоживание</li> <li>2. Наклейка на блоки</li> <li>3.Заморозки</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	24.	<p>К ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ БЫСТРОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОТНОСЯТ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Мазки – отпечатки</li> <li>2. Срезы</li> <li>3. Оба варианта верны</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	25.	<p>К ФИКСАТОРАМ ОТНОСЯТ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Формалин</li> <li>2. Метиловый спирт</li> <li>3. Оба варианта верны</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	26.	<p>ОБЕЗВОЖИВАНИЕ ПРОВОДИТСЯ ПУТЁМ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проводки через спиртовую батарею</li> <li>2. Заливки материала парафином</li> <li>3. Замочить формалине</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	27.	<p>СЛОЙ ПАРАФИНА ПРИ ПАРАФИНИРОВАНИИ НА МАТЕРИАЛЕ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1-3 мм</li> <li>2. 3-4 мм</li> <li>3. 0,5-1 см</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	28.	<p>УПЛОТНЕНИЕ МАТЕРИАЛА ПРОВОДИТСЯ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Замораживанием</li> <li>2. Заливкой в застывающую среду</li> <li>3. Оба варианта верны</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	29.	<p>ПОСЛЕ ПРОМЫВКИ МАТЕРИАЛ СЛЕДУЕТ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Парафинировать</li> <li>2. Высушить</li> <li>3. Обезводить</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	30.	<p>ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СРЕДОЙ ПРИ УПЛОТНЕНИИ :</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Хлороформ</li> <li>2. Спирт</li> <li>3. Парафин</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	31.	<p>ПОД СТЕКЛОМ НА СТОЛЕ, ГДЕ ПРОИЗВОДИТСЯ, ОКРАСКА КЛАДУТ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Листик белой и черной бумаги</li> <li>2. Желтой и синей бумаги</li> <li>3. Красной и белой бумаги</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	32.	<p>ДЛЯ ОКРАШИВАНИЯ СВОБОДНОГО ПЛАВАЮЩИХ СРЕЗОВ ИСПОЛЬЗУЮТ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Покровные стекла</li> <li>2. Часовые стекла</li> <li>3.Обыкновенное стекло</li> </ol>

ОПК-2 (знать)	33.	<p>ДЛЯ ПРИДАНИЯ ЧИСТОТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЕ ИСПОЛЬЗУЮТ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Жидкость Ценкера</li> <li>2. Жидкость Карнуа</li> <li>3. Хромпик</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	34.	<p>ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ МАТЕРИАЛА ИСПОЛЬЗУЮТ ФИКСАТОРЫ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 12%формалин</li> <li>2. 10% формалин</li> <li>3. 5%формалин</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	35.	<p>ФИКСАЦИЮ ПРОВОДЯТ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 18-20С</li> <li>2. 4С</li> <li>3. 16С</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	36.	<p>ЦЕЛЬ ПРОМЫВКИ :</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Убить клетку</li> <li>2. Получить тонкий срез</li> <li>3. Удалить фиксатор</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	37.	<p>ПАРАФИНОВЫЕ СРЕЗЫ РЕЖУТ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Мокрым ножом</li> <li>2. Нагретым до определенной температуры</li> <li>3.Сухим ножом</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	38.	<p>ПРИБОР ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТОНКИХ СРЕЗОВ:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Микроскоп</li> <li>2. Микротом</li> <li>3. Микроанаэрозат</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	39.	<p>ПРОМЕЖУТОЧНАЯ СРЕДА ДЛЯ ЗАЛИВКИ В ЦЕЛЛОИДИН:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Смесь формалина 1:1</li> <li>2. Смесь спирта и эфира 1:4</li> <li>3. Смесь спирта и эфира 1:5</li> </ol>
ОПК-2 (знать)	40.	<p>ПАРАФИН ПЛАВЯТ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ :</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 42С</li> <li>2. 54С</li> <li>3. Выше 56С</li> </ol>
ПК-5 (знать)	41.	<p>Если фиксация кусочка органа осуществляется путём погружения его в фиксатор, то метод называется:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. перфузионным</li> <li>3. иммерсионным</li> <li>4. диффузионным</li> </ol>
ПК-5 (знать)	42.	<p>Прижизненно осуществим забор материала для микроскопического исследования с помощью всех методов, исключая:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. смыв</li> <li>2. мазок</li> <li>3. соскоб</li> <li>4. биопсия</li> <li>5. аутопсия</li> <li>6. отпечаток</li> </ol>

ПК-5 (знать)	43.	Установить правильную последовательность этапов изготовления гистологических препаратов: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. изготовление блоков</li> <li>2. окраска срезов</li> <li>3. изготовление срезов</li> <li>4. взятие материала</li> <li>5. промывка</li> <li>6. химическая фиксация</li> <li>7. обезвоживание</li> <li>8. заключение срезов в бальзам</li> <li>9. специальное уплотнение</li> </ol>						
ПК-5 (знать)	44.	Для сохранения и стабилизации микроскопических структур при изготовлении препарата проводят: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. фиксацию</li> <li>2. обезвоживание</li> <li>3. декальцинацию</li> <li>4. депарафинирование</li> <li>5. окрашивание</li> </ol>						
ПК-5 (знать)	45.	Для оптического контрастирования гистологических структур при изготовлении постоянного препарата проводят: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. фиксацию</li> <li>2. обезвоживание</li> <li>3. декальцинацию</li> <li>4. депарафинирование</li> </ol> окрашивание						
ПК-5 (знать)	46.	Базофильно окрашиваются следующие структуры клетки: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. хроматин, ядрышко, цитоплазма (с высоким содержанием рибосом)</li> <li>2. хроматин, ядрышко, цитоплазма (с высоким содержанием митохондрий)</li> <li>3. хроматин, ядрышко, цитоплазма (с высоким содержанием липидов)</li> <li>4. хроматин, ядрышко, цитоплазма (с высоким содержанием основных белков)</li> <li>5. хроматин, ядрышко, цитоплазма (с высоким содержанием гликогена)</li> </ol>						
ПК-5 (знать)	47.	Оксифильно окрашиваются следующие структуры клетки: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. цитоплазма (с высоким содержанием рибосом), ядро</li> <li>2. хроматин, ядрышко, цитоплазма (с высоким содержанием митохондрий)</li> <li>3. хроматин, ядрышко, цитоплазма (с высоким содержанием липидов)</li> <li>4. цитоплазма (особенно с большим содержанием митохондрий)</li> <li>5. цитоплазма (с высоким содержанием гликогена), хромосомы</li> </ol>						
ПК-5 (знать)	48.	Установить соответствие: <i>Микроскопические методы:</i> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;"></td> <td style="text-align: right;"><i>Оптимальная</i></td> </tr> <tr> <td>1. срезы с образцов, залитых в парафин (световая микроскопия)</td> <td style="text-align: right;">а) 30-50 нм</td> </tr> <tr> <td>2. срезы с образцов, залитых в эпоксидные смолы (световая микроскопия)</td> <td style="text-align: right;">б) 5-8 мкм</td> </tr> </table>		<i>Оптимальная</i>	1. срезы с образцов, залитых в парафин (световая микроскопия)	а) 30-50 нм	2. срезы с образцов, залитых в эпоксидные смолы (световая микроскопия)	б) 5-8 мкм
	<i>Оптимальная</i>							
1. срезы с образцов, залитых в парафин (световая микроскопия)	а) 30-50 нм							
2. срезы с образцов, залитых в эпоксидные смолы (световая микроскопия)	б) 5-8 мкм							

		<p>3. срезы с замороженных образцов (световая микроскопия) в) 10 мкм</p> <p>4. срезы с образцов, взятых для электронной микроскопии г) 0,5-1 мкм</p>										
ПК-5 (знать)	49.	<p>Использование меченых атомов лежит в основе метода (ов):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. гистохимии и цитохимии</li> <li>2. иммуногистохимии и иммуноцитохимии</li> <li>3. фазово-контрастной микроскопии</li> <li>4. электронной микроскопии</li> <li>5. автордиографии</li> </ol>										
ПК-5 (знать)	50.	<p>Использование маркированных антител лежит в основе метода (ов):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. гистохимии и цитохимии</li> <li>2. иммуногистохимии и иммуноцитохимии</li> <li>3. фазово-контрастной микроскопии</li> <li>4. сканирующей электронной микроскопии</li> </ol> <p>автордиографии</p>										
ПК-5 (знать)	51.	<p>Поток электронов пропускают сквозь ультратонкий срез при использовании методов микроскопии:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. сканирующей электронной</li> <li>2. трансмиссионной электронной</li> <li>3. фазово-контрастной</li> <li>4. темнопольной</li> <li>5. флуоресцентной</li> </ol>										
ПК-5 (знать)	52.	<p>Непрерывное перемещение пучка электронов по поверхности наблюдаемого объекта применяется в методе микроскопии:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. сканирующей электронной</li> <li>2. трансмиссионной электронной</li> <li>3. фазово-контрастной</li> <li>4. темнопольной</li> <li>5. флуоресцентной</li> </ol>										
ПК-5 (знать)	53.	<p>Разрешающая способность современного светового микроскопа составляет:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1-2 мкм</li> <li>2. 0,2 мкм</li> <li>3. 0,1-0,2 нм</li> <li>4. 10 нм</li> </ol>										
ПК-5 (знать)	54.	<p>Установить соответствие:</p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"><i>Определяемые вещества:</i></td> <td style="vertical-align: top;"><i>Реакция или выявляющий реактив:</i></td> </tr> <tr> <td>1. нуклеиновые кислоты</td> <td>а) щелочные красители: гематоксилин толуидиновый синий</td> </tr> <tr> <td>2. полисахариды</td> <td>б) реактив Шиффа с периодной кислотой</td> </tr> <tr> <td>3. нейтральные жиры</td> <td>в) индифферентные красители: судановые красители</td> </tr> <tr> <td>4. кислые фосфатазы лизосом</td> <td></td> </tr> </table>	<i>Определяемые вещества:</i>	<i>Реакция или выявляющий реактив:</i>	1. нуклеиновые кислоты	а) щелочные красители: гематоксилин толуидиновый синий	2. полисахариды	б) реактив Шиффа с периодной кислотой	3. нейтральные жиры	в) индифферентные красители: судановые красители	4. кислые фосфатазы лизосом	
<i>Определяемые вещества:</i>	<i>Реакция или выявляющий реактив:</i>											
1. нуклеиновые кислоты	а) щелочные красители: гематоксилин толуидиновый синий											
2. полисахариды	б) реактив Шиффа с периодной кислотой											
3. нейтральные жиры	в) индифферентные красители: судановые красители											
4. кислые фосфатазы лизосом												

ПК-5 (знать)	55.	<p>Не верна связь в паре:</p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"><i>Определяемые структуры:</i></td> <td style="vertical-align: top;"><i>Реактивы:</i></td> </tr> <tr> <td>1. Ядра клеток</td> <td>— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий</td> </tr> <tr> <td>2. Митохондрии</td> <td>— кислые красители: эозин, кислый</td> </tr> <tr> <td>3. Лизосомы</td> <td>— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий</td> </tr> <tr> <td>4. Липидные включения</td> <td>— индифферентные красители: судан</td> </tr> <tr> <td>5. Гранулы гликогена</td> <td>— индифферентные красители: судан</td> </tr> <tr> <td>6. Рибосомы</td> <td>— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий</td> </tr> </table>	<i>Определяемые структуры:</i>	<i>Реактивы:</i>	1. Ядра клеток	— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий	2. Митохондрии	— кислые красители: эозин, кислый	3. Лизосомы	— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий	4. Липидные включения	— индифферентные красители: судан	5. Гранулы гликогена	— индифферентные красители: судан	6. Рибосомы	— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий
<i>Определяемые структуры:</i>	<i>Реактивы:</i>															
1. Ядра клеток	— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий															
2. Митохондрии	— кислые красители: эозин, кислый															
3. Лизосомы	— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий															
4. Липидные включения	— индифферентные красители: судан															
5. Гранулы гликогена	— индифферентные красители: судан															
6. Рибосомы	— щелочные красители: гематоксилин-толуидиновый синий															
ПК-5 (знать)	56.	<p>Прижизненное исследование микроскопических объектов возможно при использовании метода микроскопии:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. сканирующей электронной</li> <li>2. трансмиссионной электронной</li> <li>3. фазово-контрастной</li> <li>4. ауторадиографии</li> </ol>														
ПК-5 (знать)	57.	<p>Извлечение из клеток органелл для микроскопического исследования возможно при использовании метода:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. аспирационной биопсии (отсасывания)</li> <li>2. замораживания-скальвания</li> <li>3. гомогенизации органов и дифференциального ультрацентрифугирования</li> <li>4. лиофилизации (высушивания в вакууме)</li> </ol>														
ПК-5 (знать)	58.	<p>Количественное изучение строения микроскопических объектов (измерение), называется: _____.</p>														
ПК-5 (знать)	59.	<p>1. Возможно ли микроскопическое исследование митотического 72ИКла клеток с применением щелочных красителей (гематоксилина, азур-2)?</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. да</li> <li>2. нет</li> </ol>														
ПК-5 (знать)	60.	<p>Процедура дегидратации гистологических образцов в спиртах с восходящей концентрацией необходима для:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. фиксации материала</li> <li>2. подготовки к окрашиванию</li> <li>3. экстрагирования жиров</li> <li>4. подготовки к заливке (пластификации) монтажа на предметном стекле</li> </ol>														

## Комплект задач для текущего контроля и контроля самостоятельной работы обучающихся

Индекс компетенции	Задания
<p>ОПК-2 (уметь, владеть)</p>	<p><i>Ситуационная задача №1.</i> Рассчитайте массу солей <math>MgCl_2 \cdot 6H_2O</math>, <math>MgSO_4 \cdot 7H_2O</math> и воды, которые потребуются для приготовления буфера <math>Mg^{2+}</math> 2М, объемом 200 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №2.</i> Рассчитайте массу солей NaCl и <math>NH_4Cl</math>, которые потребуются для приготовления буфера NaCl, <math>NH_4Cl</math> 5М, объемом 50 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №3.</i> Приготовьте раствор Денхарда (Ficoll, Polyvinilpyrolidone, BSA) в концентрации 1%, 200 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №4.</i> Приготовьте 1x TBE-буфер (Tris base 89mM, Boric acid 89mM, EDTA 2mM), объемом 1000 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №5.</i> Приготовьте 10x TBE-буфер (Tris base 0,89M, Boric acid 0,89M, EDTA 20mM), объемом 1000 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №6.</i> Приготовьте буфер PEG-NaCl (NaCl 1.6M, PEG-6000 13%), объемом 150 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №7.</i> Приготовьте нейтрализующий буфер (Tris Cl 1M, NaCl 1.5M, HCl 0.81M), объемом 300 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №8.</i> Приготовьте денатурирующий буфер (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M), объемом 500 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №9.</i> Приготовьте буфер PEG-NaCl (NaCl 1.6M, PEG-6000 13%), объемом 200 мл.</p> <p><i>Ситуационная задача №10.</i> Приготовьте PBS-буфер (<math>KH_2PO_4</math> 17mM, <math>Na_2HPO_4</math> 52mM, NaCl 1.5M), объемом 0.5 л.</p>
<p>ПК-5 (уметь, владеть)</p>	<p><i>Ситуационная задача №11.</i> Опешите ход работы при выделение и фракционирование нуклеиновых кислот эукариот классическим методом: солевая экстракция ДНК из животных организмов с ДДС –Na (додецилсульфата натрия).</p> <p><i>Ситуационная задача №12.</i> Опешите подробно подготовку и постановку специфической амплификации ДНК с помощью полимеразы, осуществляющей избирательный синтез взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с двух праймеров (затравок).</p> <p><i>Ситуационная задача №13.</i> Опешите последовательность действий при анализе ДНК методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.</p>

## 8. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

### а) Список рекомендуемой литературы

#### основная:

1. Биологические методы научных исследований (избранные лекции) [Электронный ресурс] : учебное пособие / . — Электрон. текстовые данные. — Омск: Сибирский государственный университет физической культуры и спорта, 2014. — 76 с. — 2227-8397. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/iprbooks-reader?publicationId=64973>
2. Вознесенский Э.Ф. Методы структурных исследований материалов. Методы микроскопии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Вознесенский Э.Ф., Шарифуллин Ф.С., Абдуллин И.Ш.— Электрон. текстовые данные.— Казань: Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2014.— 184 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/61986.html>

#### дополнительная:

1. Гигани О.Б., Биология: руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс]: учебное пособие / Под ред. Гигани О.Б. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 272 с. - ISBN 978-5-9704-3726-1 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970437261.html>
2. Маркина В.В., Биология. Руководство к практическим занятиям [Электронный ресурс]: учебное пособие / Маркина В.В., Оборотистов Ю.Д., Лисатова Н.Г. и др.; Под ред. В.В. Маркиной - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 448 с. - ISBN 978-5-9704-3415-4 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434154.html>
3. Чебышев Н.В., Биология. Руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс]: учеб. пособие / под ред. Н.В. Чебышева. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 384 с. - ISBN 978-5-9704-3411-6 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434116.html>
4. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс] : учебно-справочное пособие / С.Н. Щелкунов. — Электрон. текстовые данные. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017. — 514 с. — 978-5-379-02024-8. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/65273.html>
5. Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами [Электронный ресурс] : монография / Ю.Д. Нечипуренко. — Электрон. текстовые данные. — Ижевск: Регулярная и хаотическая динамика, Институт компьютерных исследований, 2015. — 190 с. — 978-5-4344-0295-8. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/69338.html>

**учебно-методическая:**

1. Курносова, Н. А. Лабораторные методы исследований в биологии : учеб.-метод. комплекс / Н. А. Курносова; УлГУ, ИМЭиФК. - Ульяновск : УлГУ, 2009. – 13с.

**б) программное обеспечение**

1. ОС MicrosoftWindows (контракт №580 от 29.08.2014, контракт №581 от 29.08.2014)
2. MicrosoftOffice 2016 (договор №991 от 21.12.2016)
3. «МойОфис Стандартный» (договор №793 от 14.12.2018)
4. StatisticaBasicAcademicforWindows 13 (510 от 06.08.2018)

**в) профессиональные базы данных, информационно-справочные системы**

**1. Электронно-библиотечные системы:**

1.1. **IPRbooks** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / группа компаний Ай Пи Эр Медиа . - Электрон. дан. - Саратов , [2019]. - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru>.

1.2. **ЮРАЙТ** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / ООО Электронное издательство ЮРАЙТ. - Электрон. дан. – Москва , [2019]. - Режим доступа: <https://www.biblio-online.ru>.

1.3. **Консультант студента** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / ООО Политехресурс. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/pages/catalogue.html>.

2. **КонсультантПлюс** [Электронный ресурс]: справочная правовая система. /Компания «Консультант Плюс» - Электрон. дан. - Москва : КонсультантПлюс, [2019].

3. **База данных периодических изданий** [Электронный ресурс] : электронные журналы / ООО ИВИС. - Электрон. дан. - Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://dlib.eastview.com/browse/udb/12>.

4. **Национальная электронная библиотека** [Электронный ресурс]: электронная библиотека. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://нэб.рф>.

5. **Электронная библиотека диссертаций РГБ** [Электронный ресурс]: электронная библиотека / ФГБУ РГБ. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://dvs.rsl.ru>.

**6. Федеральные информационно-образовательные порталы:**

6.1. Информационная система Единое окно доступа к образовательным ресурсам. Режим доступа: <http://window.edu.ru>

6.2. Федеральный портал Российское образование. Режим доступа: <http://www.edu.ru>

**7. Образовательные ресурсы УлГУ:**

7.1. Электронная библиотека УлГУ. Режим доступа : <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Web>

7.2. Образовательный портал УлГУ. Режим доступа : <http://edu.ulsu.ru>