

ББК 28.05я73

Б 26

Барсуков Н. П.

Б 26 Цитология, гистология, эмбриология. Лабораторный практикум: Учебное пособие. — 3-е изд., перераб. и доп. — СПб.: Издательство «Лань», 2019. — 260 с.: ил. — (Учебники для вузов. Специальная литература).

ISBN 978-5-8114-3335-3

Лабораторный практикум, включая задания для самостоятельной подготовки по дисциплине «Цитология, гистология и эмбриология», составлен в соответствии с примерной программой учебной дисциплины для подготовки специалистов по специальности «Ветеринария» и бакалавров направления подготовки «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

Пособие содержит ситуационные задачи, тесты (ряд из них оригинальные) и вопросы для самоконтроля глубины усвоения теоретического материала по отдельным темам дисциплины, вопросы к итоговым модульным контрольным работам и экзаменам, перечень гистологических препаратов и электронограмм, знание которых необходимо для дальнейшего успешного изучения курса патологической анатомии и освоения клинических дисциплин.

ББК 28.05я73

Рецензенты:

В. В. ЛЕМЕЩЕНКО — доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой анатомии и физиологии домашних животных Академии биоресурсов и природопользования Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского;

В. И. УСЕНКО — доктор биологических наук, профессор кафедры анатомии, патологической анатомии и гистологии Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана;

И. С. КОНСТАНТИНОВА — кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, патологической анатомии и гистологии Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана.

Обложка

Е. А. ВЛАСОВА

© Издательство «Лань», 2019

© Н. П. Барсуков, 2019

© Издательство «Лань»,

художественное оформление, 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АОК** — антителообразующая клетка.
АПК — антигенпредставляющая клетка.
АЭС — агранулярная эндоплазматическая сеть.
ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть.
Г.-э. — гематоксилин и эозин.
Гем-н — гематоксилин.
Железн. гем-н — железный гематоксилин.
КРС — крупный рогатый скот.
ЭПС — эндоплазматическая сеть.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Дисциплина «Цитология, гистология и эмбриология» наряду с другими фундаментальными медико-биологическими дисциплинами изучает закономерности структурной организации живой материи. Овладение основами дисциплины даёт возможность студентам получить представление об особенностях развития, морфологии и функциональном значении различных органов животных на последовательных этапах пренатального и постнатального онтогенеза.

Цель данного пособия — помочь студентам адаптировать теоретические знания, приобретенные в процессе самостоятельной подготовки, к творческому анализу микропрепаратов и электронограмм, отражающих особенности строения клеток, тканей и органов животных на светооптическом и ультрамикроскопическом уровнях иерархической организации их организма (субклеточном, клеточном, тканевом, органном и организменном) в процессе лабораторных занятий по данной дисциплине.

Результативность решения ситуационных задач, тестов, правильности ответов на контрольные вопросы во многом зависит не только от качества усвоения теоретического материала в процессе самостоятельной подготовки по той или иной теме, но и от параллельного тщательного анализа иллюстраций в учебниках и атласах. Это способствует формированию абстрактного мышления, необходимого для образного воспроизведения морфологии изучаемых микроскопических объектов в трёхмерном пространстве по их тонким плоскостным срезам в гистологических препаратах.

По завершении самостоятельной подготовки к очередному лабораторному занятию глубину усвоения теоретического материала необходимо проверить, отвечая на контрольные вопросы по каждой теме, решая ситуационные задачи и тесты.

Лабораторное занятие считается зачѐнным, если студент получил положительную оценку по теоретической части, полностью выполнил домашнее задание и сделал необходимые зарисовки с микропрепаратов в рабочей тетради с использованием цветных карандашей и обозначением необходимых учебных элементов.

Модульные контроли усвоения теоретического материала и диагностика микропрепаратов осуществляются в письменной форме при отсутствии у студентов академической задолженности, после выполнения всех заданий по самостоятельной внеаудиторной работе и успешного предварительного компьютерного тестирования по пройденным темам.

МОДУЛЬ 1
ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА.
ОСНОВЫ ЦИТОЛОГИИ.
СРАВНИТЕЛЬНАЯ
ЭМБРИОЛОГИЯ

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №1. ТЕХНИКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: УСТРОЙСТВО СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НИМ. МЕТОДЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. ПРАВИЛА ИЗГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Цель занятия: ознакомиться с методами микроскопических исследований. Изучить устройство светового микроскопа и освоить правила работы с ним. Изучить этапы изготовления и контрастирования гистологических препаратов. Иметь чёткое представление о значении терминов *базофилия* (от лат. basis — основание), *оксифилия*, или *ацидофилия* (от греч. оху или лат. acidum — кислота), *нейтрофилия*, *метахромазия* и др.

Правила работы с микроскопом

1. Взять закреплённый за вами микроскоп в шкафу и перенести его на рабочее место. Установить микроскоп на краю стола таким образом, чтобы зеркало было обращено к источнику света, а тубус — к наблюдателю.

2. С помощью револьвера установить объектив малого увеличения (8×) в вертикальном положении, а затем, вращая макровинт, переместить его на расстояние около 7–8 мм от поверхности предметного столика.

3. Изменяя угол наклона зеркала, добиться оптимального равномерного освещения поля зрения.

4. Поместить гистологический препарат на предметный столик так, чтобы покровное стекло было обращено кверху, а исследуемый объект находился по центру пучка света.

5. Вращая макровинт «на себя», вывести объект в фокус и добиться чёткого его изображения. Изучить микропрепарат на малом увеличении, а для более детального его рассмотрения необходимо использовать большое увеличение.

6. Для этого, не изменяя положения подвижной части микроскопа, плавным поворотом револьвера установить объектив большого увеличения (40×), проследив за его фиксацией в вертикальном положении (услышать щелчок фиксатора).

7. При установке объектива 40× свободное расстояние между верхней поверхностью препарата и нижней поверхностью объектива очень мало (около 0,4 мм), поэтому при изучении препарата на большем увеличении необходимо пользоваться только микровинтом, осторожно вращая его в ту или иную сторону на полоборота. При этом необходимо чётко следить за изменением резкости объекта. Если резкость ухудшается, то микровинт надо вращать в противоположную сторону, следя за изменением резкости. Пользоваться микровинтом необходимо особо осторожно, так как можно раздавить микропрепарат и повредить линзу объектива.

Добившись резкости и меняя фокус, можно рассмотреть все уровни объекта в пределах толщины среза.

8. После детального изучения микропрепарата приступить к зарисовке тех структур объекта, которые определены заданием.

9. По окончании изучения и зарисовки микропрепарата необходимо поворотом револьвера перевести микроскоп с большого увеличения (40×) на малое (8×) и после этого снять препарат с предметного столика.

10. Рассматривать объект в микроскопе необходимо левым глазом, правый глаз при этом должен быть открытым. Это предотвращает от переутомления глазные мышцы того глаза, которым ведётся наблюдение.

Примечание: необходимо помнить, что видимое изображение в микроскопе является обратным, увеличенным и мнимым.

Приобрести навыки работы с микроскопом, неоднократно повторая перечисленные выше манипуляции.

Методы микроскопических исследований

Основным методом исследования в гистологии является микроскопирование — изучение гистологических препаратов под микроскопом.

Световая микроскопия. Современные микроскопы обладают высокоразрешающей способностью. Разрешающая способность определяется наименьшим расстоянием (d) между двумя рядом расположенными точками, которые можно видеть раздельно. Это расстояние зависит от длины световой волны (λ) и выражается формулой: $d = 1/2\lambda$. Минимальная длина волны видимой части спектра — 0,4 мкм. Следовательно, разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм, а общее увеличение достигает 2500 раз.

Ультрафиолетовая микроскопия. Длина волны ультрафиолетового света — 0,2 мкм, следовательно, разрешающая способность ультрафиолетового микроскопа 0,1 мкм, но так как ультрафиолетовое излучение является невидимым, то для наблюдения исследуемого объекта необходим люминесцентный экран.

Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия. Коротковолновое (невидимое) излучение, поглощаясь рядом веществ, возбуждает их электроны, которые излучают свет с большей длиной волны, становясь видимой частью спектра. Таким образом добиваются повышения разрешающей способности микроскопа.

Фазовоконтрастная микроскопия позволяет изучать неокрашенные объекты.

Поляризационная микроскопия применяется для изучения архитектуры гистологических структур (волоконистых компонентов).

Микроскопия в темном поле применяется для изучения живых объектов.

Микроскопия в падающем свете предназначена для изучения толстых объектов.

Электронная микроскопия даёт возможности изучать объекты, увеличенные в десятки тысяч раз. Разрешающая способность составляет 0,1–0,7 нм. Имеются две разновидности электронной микроскопии — просвечивающая (трансмиссионная) и сканирующая (или растровая) микроскопия, дающая отображение поверхностных ультраструктур.

Микрофотосъёмка и микрокиносъёмка. Эти методы позволяют изучать фиксированные объекты на фотографиях и живые микроскопические объекты в движении.

Для микроскопии используют различные *конструкции микроскопов*, позволяющие изучать различные параметры гистологических препаратов.

Указанные виды микроскопии широко сочетаются с другими методами, позволяющими изучать не только качественный состав содержимого клеток и тканей, но и количественное содержание в них различных биополимеров, темпы дифференцировки и обмена веществ в норме и патологии.

Гисто- и цитохимические методы применяются для определения состава химических веществ и их количества в определенных структурах. Принцип метода заключается в химической реакции между реактивом и субстратом, содержащимся в исследуемом веществе. При этом образующиеся побочные продукты реакции можно обнаружить с помощью световой или люминесцентной микроскопии.

Метод гистоавторадиографии позволяет выявить состав химических веществ в исследуемых структурах и интенсивность обмена по включению радиоактивных изотопов. Данный метод чаще всего используется при экспериментах на животных.

Метод интерферометрии позволяет определять сухую массу вещества в живых или фиксированных объектах.

Метод культуры клеток — это выращивание клеток в пробирках или в особых капсулах в организме (*метод Лазоренко*) и последующее изучение живых клеток под микроскопом.

Прижизненное (витальное) окрашивание используется для изучения явлений фагоцитоза и активности макрофагов, фильтрационной способности почечных канальцев и др. Животным в кровь или в брюшную полость вводят краситель (трепановый синий, тушь), который захватывается определенными клетками — макрофагами, а в почках окрашивается цитоплазма нефроцитов при фильтрации плазмы крови. После убоя животного и приготовления препарата изучают клетки, содержащие краситель.

Иммуноморфологические методы позволяют с помощью предварительно проведенных иммунных реакций (на основе взаимодействия антиген — антитело) определять субпопуляцию лимфоцитов, степень чужеродности клеток, проводить гистологическое типирование тканей и органов, т. е. определять их гистосовместимость для дальнейшей трансплантации.

Метод трансплантации тканей применяют с целью изучения поведения и морфофункционального состояния клеток при их пересадке в другой организм. К примеру, этот метод используется для поддержания жизни животных, подверженных облучению смертельной дозой.

Дифференциальное центрифугирование — изучение отдельных органелл или даже их фрагментов, выделенных из клетки. Для этого кусочек исследуемого органа растирают, заливают физиологическим раствором, а затем разгоняют в центрифуге при различных оборотах (от 2 тыс. до 150 тыс. в 1 мин). В результате центрифугирования получают интересующие фракции, которые затем изучают различными методами.

Методы морфометрии — количественные методы. Они позволяют определять размеры и объемы ядра — *кариометрия*, клеток — *цитометрия*, органелл — электронная морфометрия, а также определять число клеток различных популяций и субпопуляций. Данные методы широко используются в научных исследованиях.

Микроманипуляции. Данный метод получил применение в молекулярной биологии, генной инженерии, а также при клонировании (когда с помощью микроманипулятора удаляют ядро из яйцеклетки с гаплоидным набором хромосом и пересаживают в неё ядро соматической клетки с диплоидным набором хромосом).

Экспериментальные методы — пищевая и водная нагрузки, физические методы (УВЧ, СВЧ, лазеры, магниты). Они применяются для изучения реакции интересующих структур на то или иное воздействие и сочетаются с методами морфометрии, цито- и гистохимии. Данные методы также применяются в научных исследованиях.

Изготовление гистологических препаратов

Гистологические препараты, исследуемые в световом микроскопе, должны отвечать следующим требованиям: быть прозрачными и контрастными.

Это достигается следующими операциями:

1. *Взятие материала* из различных органов и тканей, размеры которого не должны превышать 1 кубического сантиметра.

2. *Фиксация материала* производится для обеспечения стабилизации составляющих его структур и сохранности (фиксатор предотвращает аутолиз, обладает консервирующими свойствами).

Фиксаторы бывают простые и сложные. Простые фиксаторы состоят из одного консерванта. В состав сложных фиксаторов входит два и более химических веществ. К простым фиксаторам относятся этиловый и метиловый спирты, формальдегид, глутаральдегид; кислоты: пикриновая, уксусная, осмиевая; соли тяжелых металлов: бихромат калия, сулема и др. К сложным фиксаторам относятся смеси нескольких простых, например жидкость Карнуа, Буэна и др.

3. *Обезвоживание материала* осуществляется с целью дальнейшей возможности пропитывания его специальными уплотняющими веществами. В качестве обезвоживающих веществ используются спирты повышающей концентрации (от 60° до 100°).

4. *Просветление материала* производят в том случае, если уплотнение его будет осуществляться с помощью парафина. К просветляющим веществам относятся бензол, ксилол, толуол, хлороформ и др.

5. *Уплотнение материала* производится для получения тончайших прозрачных срезов исследуемых объектов. В световой микроскопии это достигается пропитыванием материала специальными уплотнителями: расплавленным парафином, раствором целлоидина в эфире, желатиной или замораживанием в криостате. Для электронно-