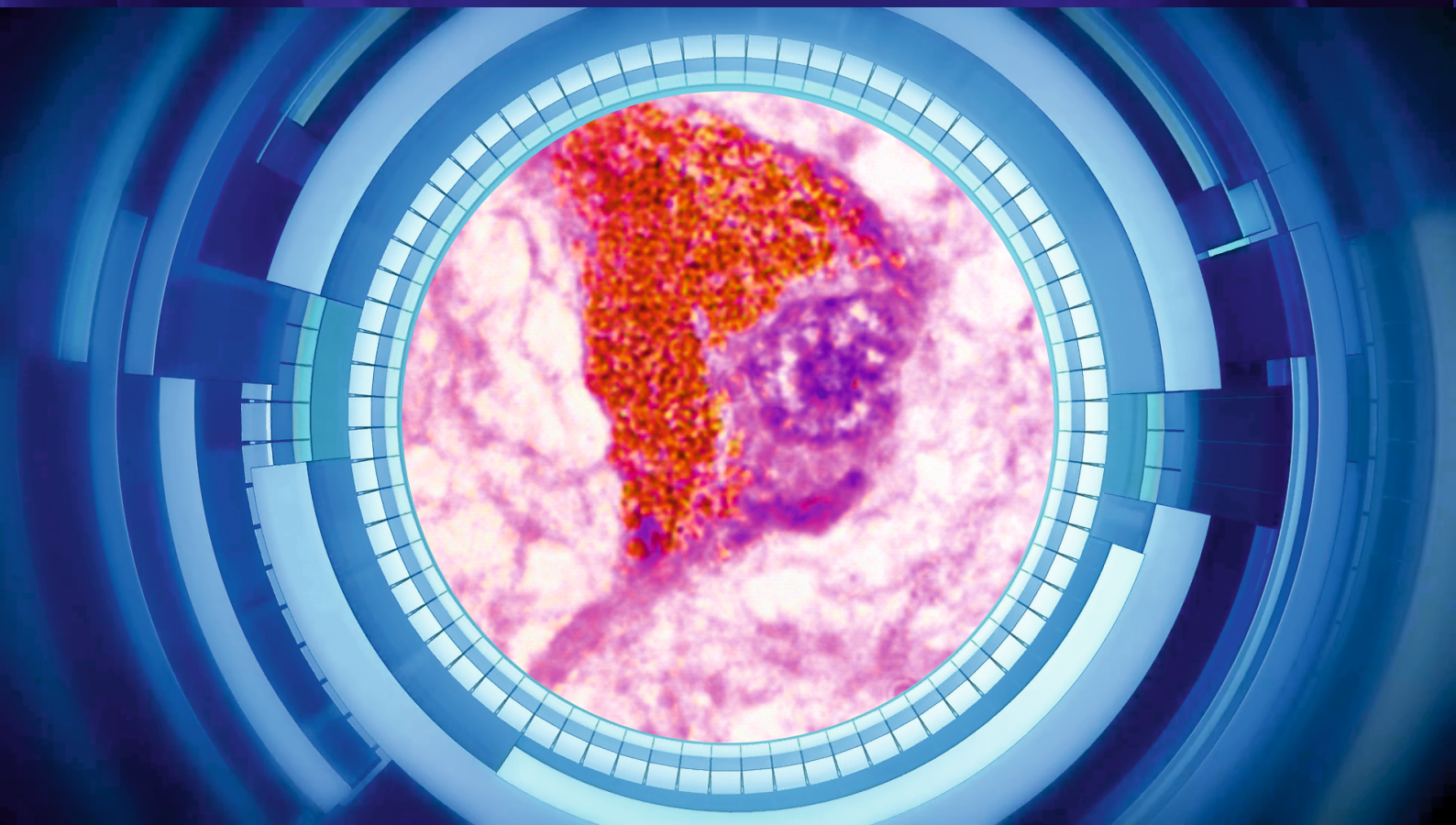


,

,



I

**Владивосток  
2021**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Дальневосточный федеральный университет  
Школа медицины

# ГИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ЭМБРИОЛОГИЯ

Учебное пособие

*Для студентов, обучающихся по программе высшего образования  
по специальностям «Лечебное дело», «Медицинская биохимия»,  
«Медицинская биофизика»*

В т р е х   ч а с т я х

*Научный редактор*  
доктор медицинских наук, профессор Г.В. Рева

Часть I  
**ЦИТОЛОГИЯ**

Владивосток



2021

© Рева Г.В., Рева И.В., Можилевская Е.С.,  
Новиков А.С., Ямамото Т., 2021

© Оформление. ФГАОУ ВО ДВФУ, 2021

ISBN 978-5-7444-5240-7

ISBN 978-5-7444-5241-4 (ч. I)

УДК 575.853:576.31(075.8)  
ББК 28.705я73

*Рекомендовано Учебно-методическим советом  
Школы медицины ФГАОУ ВО ДВФУ в качестве учебного пособия  
для студентов, обучающихся по программе высшего образования  
по специальностям «Лечебное дело», «Медицинская биохимия»,  
«Медицинская биофизика»*

*Авторы:*

*Г.В. Рева, д-р мед. наук, профессор; И.В. Рева, канд. мед. наук, PhD;  
Е.С. Можилевская, канд. мед. наук; А.С. Новиков, канд. мед. наук;  
Т. Ямамото, PhD, профессор.*

*Рецензенты:*

*М.Ю. Флейшман, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник  
ЦНИЛ ДВГМУ (marfl@yandex.ru);  
В.В. Усов, д-р мед. наук, профессор ДВФУ (victus-vlad@yandex.ru).*

**Гистология, цитология, эмбриология** : учебное пособие : для студентов, обучающихся по программе высшего образования по специальностям «Лечебное дело», «Медицинская биохимия», «Медицинская биофизика». В 3 частях. Часть 1. Цитология / Г.В. Рева, И.В. Рева, Е.С. Можилевская, А.С. Новиков, Т. Ямамото ; ДВФУ, Школа медицины ; научн. ред. Г.В. Рева. – Владивосток : Издательство Дальневосточного федерального университета, 2021. – [139 с. : ил]. – ISBN 978-5-7444-5241-4. – URL: <https://www.dvfu.ru/science/publishing-activities/catalogue-of-books-fefu/>. – Дата публикации: 24.12.2021. – Текст. Изображение : электронные.

Пособие написано в соответствии с действующей образовательной программой и новейшими данными по гистологии, цитологии и эмбриологии человека для студентов медицинских факультетов медицинских вузов и школ медицины университетов. Основная задача пособия – в краткой форме представить необходимую информацию для успешной работы во время практических занятий и при самостоятельной работе на кафедре с целью развития навыков изучения микроструктуры тканей и выявления их основных морфологических признаков. В материалах учебного пособия содержатся вопросы для определения исходного уровня знаний, вопросы для текущего контроля знаний, а также тесты и ситуационные задачи для итоговых контролей по семестрам. Дана мотивация необходимости изучения различных тем по предмету и рекомендован оптимальный алгоритм действия студента на практических занятиях по темам в соответствии с требованиями образовательной программы для успешного усвоения материала.

*Текстовое электронное издание*

Минимальные системные требования:

Веб-браузер Internet Explorer версии 6.0 или выше,  
Opera версии 7.0 или выше, Google Chrome версии 3.0 или выше.

Компьютер с доступом к сети Интернет.

Минимальные требования к конфигурации и операционной системе  
компьютера определяются требованиями перечисленных  
выше программных продуктов.

Размещено на сайте 24.12.2021 г.

Объем 9,80 Мб

Дальневосточный федеральный университет

690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10.

E-mail: [prudkoglyad.sa@dvfu.ru](mailto:prudkoglyad.sa@dvfu.ru)

Тел.: 8 (423) 226-54-43

© Рева Г.В., Рева И.В., Можилевская Е.С., Новиков А.С., Ямамото Т., 2021

© Оформление. ФГАОУ ВО ДВФУ, 2021



## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ НА КАФЕДРЕ.....	5
ТЕМА 1. ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА .....	7
ТЕМА 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСТОЯННОГО ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА .....	23
ТЕМА 3. ФОРМЫ ОРГАНИЗАЦИИ ЖИВОЙ МАТЕРИИ. ЦИТОПЛАЗМА И ЯДРО КЛЕТКИ.....	46
ТЕМА 4. МОРФОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКЕ.....	58
ТЕМА 5. СПОСОБЫ РЕПРОДУКЦИИ КЛЕТОК. РЕАКЦИЯ КЛЕТКИ НА ПОВРЕЖДЕНИЕ .....	80
ТЕМА 6. СЕМИНАР «ЦИТОЛОГИЯ» .....	113
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	115
ТЕСТЫ ПО ЦИТОЛОГИИ.....	121
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ.....	125
СПИСОК УЧЕБНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И ИНФОРМАЦИОННО- МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ .....	130

## **ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ НА КАФЕДРЕ**

Основными формами работы со студентами на кафедре являются лекции и практические занятия. Изучение крупных разделов завершается итоговым семинаром, на котором преподаватель, используя различные формы контроля: решение тестов, опросы-беседы, диагностику микропрепаратов и микрофотографий, решение ситуационных задач, устанавливает и оценивает степень усвоения знаний студентами, а в конце курса (3 семестр) студенты сдают заключительный экзамен. В билет входят вопросы по цитологии, общей и частной гистологии, эмбриологии, также предлагается диагностировать микропрепарат и идентифицировать структуры на срезе, определить окрашивание препарата. Кроме этого, к билету прилагаются электронограмма, тест-контроль с выбором наиболее полного и правильного ответа, а также ситуационная задача, направленная на развитие клинического мышления у студентов.

Задачей практического занятия является изучение морфологической организации клеток, тканей, органов и умение связать их строение с выполняемыми функциями. Студент должен овладеть навыками самостоятельной диагностики гистологических препаратов, научиться идентифицировать структуры в исследуемых срезах, воспроизводить гистологическую структуру в виде альбомных рисунков. Студент после прохождения обучения по гистологии, цитологии, эмбриологии должен знать нормальную структуру клеток и тканей, а также структурно-функциональные единицы органов, что является необходимым условием для понимания механизмов изменений в них в патологических условиях. Поэтому гистология с цитологией и эмбриологией являются фундаментальной основой для изучения клинических дисциплин (внутренние болезни, акушерство и гинекология и др.) и тесно связаны с патологической анатомией.

Таким образом, представленное учебно-методическое пособие по гистологии, цитологии и эмбриологии, занимая важное место в системе медицинского образования, закладывает фундаментальные основы научного структурно-функционального подхода в анализе жизнедеятельности организма человека в норме и при патологии.

### **Правила работы студентов на практических занятиях:**

1. Студентам запрещается работать в учебной аудитории и гистологической лаборатории без присутствия преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.

2. Для выполнения каждой лабораторной работы можно приступать только после получения инструктажа по технике безопасности и разрешения преподавателя.

3. За 5-10 минут до начала занятий дежурный принимает учебную комнату и после предъявления студенческого билета получает у лаборанта учебные пособия для практической работы всей группы. Дежурный несет ответственность за сохранность учебных пособий, микроскопических препаратов, таблиц, микроскопов, а также за общий порядок в учебной комнате во время работы. По окончании практического занятия дежурный сдает учебную комнату и получает студенческий билет у лаборанта.

4. К началу занятий студенты должны быть готовы для его проведения – надеть халаты, убрать портфели на специально отведенное место, приготовить для работы альбомы и набор цветных карандашей и получить у дежурного учебные пособия. Каждому студенту предоставляется закрепленный за ним микроскоп и набор соответствующих препаратов.

5. На занятие студенты должны приходить с подготовленным теоретическим материалом. В начале занятия и в ходе любого его этапа подготовка контролируется преподавателем. В случае неудовлетворительной теоретической подготовки и отсутствия рисунков гистологических препаратов в альбоме данное занятие студенту не зачитывается.

6. Во время самостоятельной работы на практических занятиях требуется соблюдать дисциплину, поддерживать порядок, бережно обращаться с микроскопами, гистологическими препаратами, таблицами и другим кафедральным имуществом.

7. Все работы, связанные с применением электроприборов должны проходить под наблюдением преподавателя (лаборанта).

8. При неисправности в работе электроприбора (например, подсветка в микроскопе) необходимо обратиться к преподавателю. Чинить самостоятельно приборы запрещается.

9. На стенде «Учебно-методические материалы кафедры» студенты должны ознакомиться с календарным расписанием и темами лекций, практических и итоговых занятий, контрольными вопросами для подготовки, с графиком сдачи отработок, а также объявлениями и другой необходимой информацией.

10. По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: вытереть доску, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы, закрыть окна, сдать аудиторию лаборанту кафедры.

# ТЕМА 1. ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА

## Краткое содержание темы

### Современные виды микроскопической техники.

Главными этапами цитологического и гистологического анализа являются выбор объекта исследования, его подготовка для изучения под микроскопом, качественный и количественный анализ изображений гистологических элементов.

Объектами исследования служат живые и фиксированные клетки и ткани, их изображения, полученные при использовании световых и электронных микроскопов или на экране дисплея. Существует ряд методов, позволяющих проводить анализ указанных объектов.

Основным методом изучения биологических микрообъектов является световая микроскопия, которая широко используется в экспериментальной и клинической практике. Микроскопирование – главный метод изучения микрообъектов, используемый в биологии и медицине более 300 лет. С момента создания и применения первых микроскопов они постоянно совершенствовались. Современные микроскопы представляют собой сложные оптические системы, обладающие высокой разрешающей способностью. Размер самой маленькой структуры, которую можно видеть с помощью микроскопа, определяется наименьшим разрешаемым расстоянием ( $d$ ), которое в основном зависит от длины волны света ( $\lambda$ ) и длины волн электромагнитных колебаний потока электронов и др. Эта зависимость приближенно определяется формулой  $d = \lambda/2$ . Таким образом, чем меньше длина волны, тем меньше разрешаемое расстояние, и тем меньшие по размерам микроструктуры можно видеть в препарате.



Рис. 1. Микроскоп Янсена





*Рис.2. Левенгук – основоположник микроскопии*



*Рис. 3. Первый микроскоп фирмы Nikon*

**Световая микроскопия.** Для изучения гистологических микрообъектов применяют обычные световые микроскопы и их разновидности, в которых используются источники света с волнами различной длины. В обычных световых микроскопах источником освещения служит естественный или искусственный свет. Минимальная длина волны видимой части спектра примерно 0,4 мкм. Следовательно, для обычного светового микроскопа наименьшее разрешаемое расстояние приблизительно составляет 0,2 мкм, а общее увеличение (произведение увеличения объектива на увеличение окуляра) может быть 1500-2500.



*Рис. 4. Бинокулярный микроскоп*

Таким образом, с помощью светового микроскопа можно увидеть не только отдельные клетки размером от 4 до 150 мкм, но и их внутриклеточные структуры – органеллы, включения. Для усиления контрастности микрообъектов применяют их окрашивание.

**Ультрафиолетовая микроскопия.** Это разновидность световой микроскопии. В ультрафиолетовом микроскопе используют более короткие ультрафиолетовые лучи с длиной волны около 0,2 мкм. Разрешаемое расстояние здесь в 2 раза меньше, чем в обычных световых микроскопах, и составляет приблизительно 0,1 мкм. Полученное в ультрафиолетовых лучах невидимое глазом изображение преобразуется в видимое с помощью регистрации на фотопластинке или путем применения специальных устройств (люминесцентный экран, электронно-оптический преобразователь).

**Флуоресцентная** микроскопия позволяет изучать как собственную (первичную) флуоресценцию ряда веществ, так и вторичную флуоресценцию, вызывая окрашиванием биологических структур специальными красителями – флуорохромами. Принцип метода состоит в том, что некоторые вещества при световом облучении сами начинают светиться, причём длина волны испускаемого ими света всегда больше, чем длина волны света, возбуждающего флуоресценцию. Поэтому для возбуждения флуоресценции в видимой части спектра обычно пользуются синими или ультрафиолетовыми лучами. Собственной флуоресценцией обладают нуклеиновые кислоты, рибофлавин и ряд др. В качестве флуорохрома чаще всего применяют акридиновый оранжевый. Флуоресценцию можно наблюдать визуально и фотографировать. Всеми необходимыми качествами для производства флуоресцентной микроскопии обладает наш отечественный микроскоп МЛ-2.



*Рис. 5. Люминесцентный микроскоп*



*Рис. 6. Микроскоп системы Olympus*

**Поляризационная микроскопия** используется в цитологии для определенных целей. Она позволяет выявить структуры с упорядоченным расположением молекул (например, кристаллы или фибриллярные белки).



*Рис. 7. Поляризационный микроскоп*

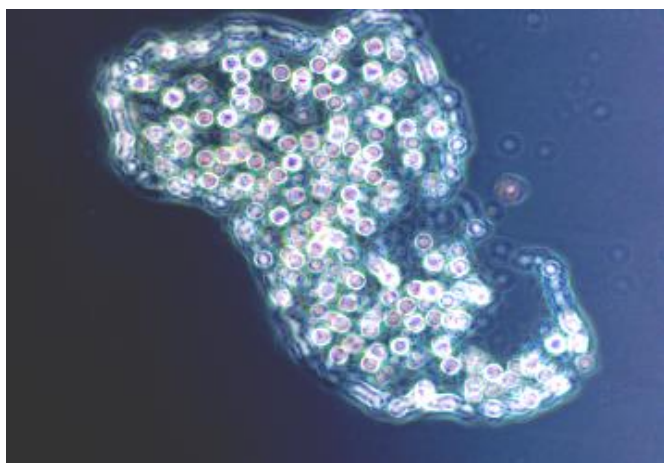
Такие структуры обладают, как известно, двойным лучепреломлением (анизотропией): проходящий через них световой луч разделяется на два, распространяющихся с различной скоростью и в различных направлениях. В поле



зрения поляризационного микроскопа анизотропные объекты оказываются ярко светящимися на темном поле. Отечественный микроскоп МИН-8 является отличным прибором и вполне удовлетворяет исследователей-биологов. На кафедре имеется микроскоп "Варшава".

**Интерференционная** микроскопия тоже основана на применении поляризационного света. На основе эффекта фазового сдвига можно судить о структурах объекта и плотности отдельных участков: т.к. сдвиг связан с плотностью структуры, то, измерив величину клетки (или её части), можно найти её сухой вес в граммах.

**Фазово-контрастная микроскопия** позволяет изучать живые и неокрашенные объекты за счёт повышения их контрастности. При прохождении света через окрашенные объекты происходит изменение амплитуды световой волны, а при прохождении через неокрашенные – фазы световой волны, что используют для получения высококонтрастного изображения в фазово-контрастной и интерференционной микроскопии. Для получения фазовоконтрастного изображения свет от источника разбивается на два когерентных световых луча, один из них называют опорным, другой предметным, которые проходят разные оптические пути. Микроскоп юстируют таким образом, чтобы в фокальной плоскости, где формируется изображение, интерференция между этими двумя лучами гасила бы их.

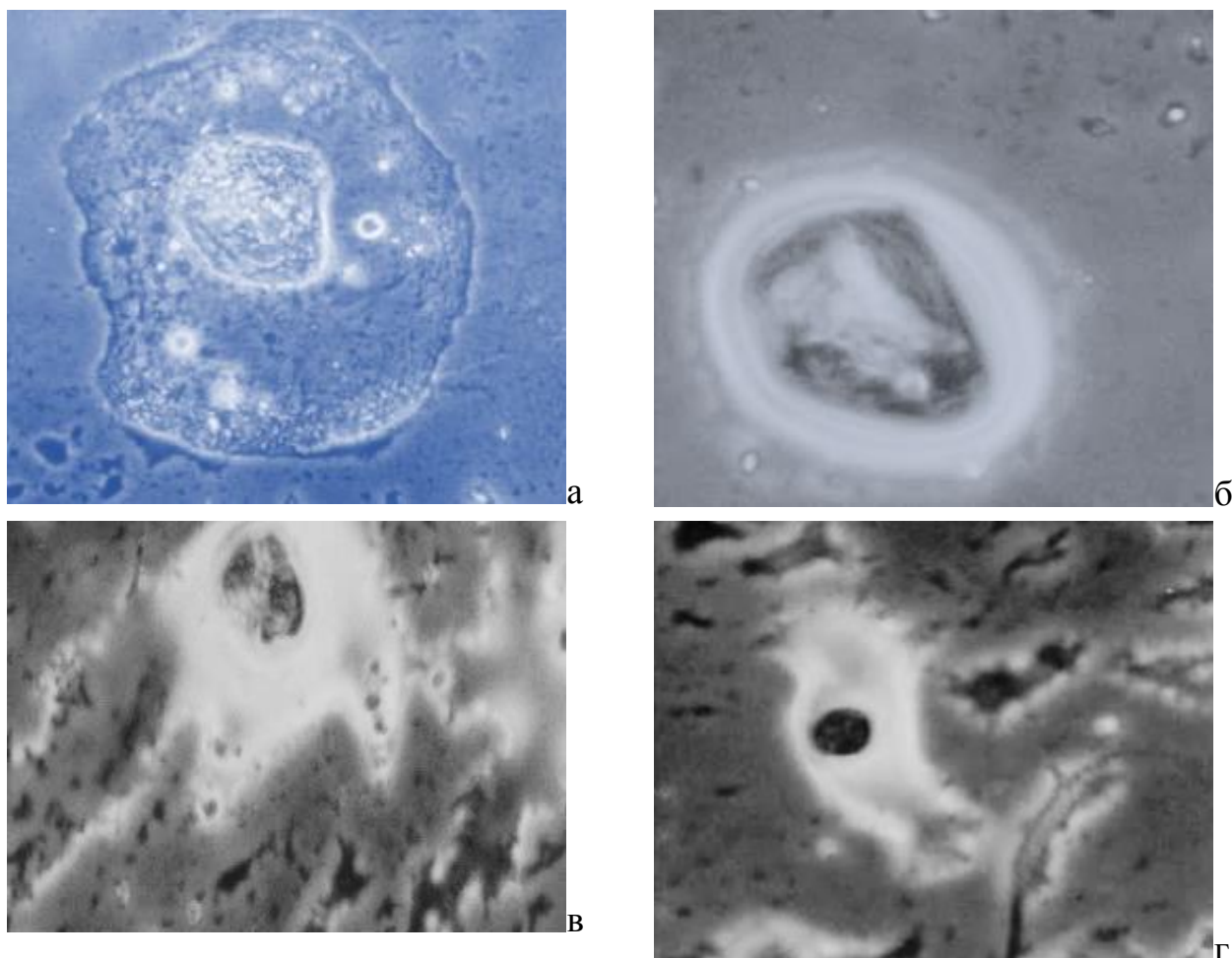


а



б

*Рис. 8. Эпителиоциты в соскобе со слизистой оболочки десны человека, изученный с помощью фазовоконтрастной микроскопии (фото Рева Г.В., Рева И.В., Толмачева В.Е.).*



*Рис. 9. Макрофаг (а), нейтрофил (б), дендритная клетка (в), эпителиоцит (г) из слизи на поверхности эпителиальной пластинки слизистой оболочки ЖКТ ребёнка.  
(фото Рева Г.В., Рева И.В.)*

Принцип работы фазовоконтрастного микроскопа основан на том, что длину оптического пути изменяют с помощью так называемой фазовой пластинки, расположенной на фазовом кольце. Когда на пути одного из лучей находится образец, преломление света в нём изменяет оптический путь, а, следовательно, и фазу, что изменяет условия интерференции. Фазово-контрастная микроскопия особенно популярна в биологии, поскольку не требует предварительного окрашивания клетки, из-за которого та может погибнуть. Фазово-контрастный метод открыт в 1930 году голландским физиком, математиком и химиком Фрицем Цернике и использован для создания первых фазово-контрастных микроскопов, широко применяемых в биологических и медицинских исследованиях, поскольку не требуют предварительного окрашивания клеток, из-за которых те могут погибнуть. Для повышения контрастности фазовые кольца покрывают металлом, поглощающим прямой свет, не влияя на сдвиг фазы. В оптической системе микроскопа применяют специальный конденсор с револьвером диафрагм и центрирующим устройством; объективы заменяют на иммерсионные объективы-апохроматы.

В настоящее время одним из наиболее современных видов микроскопической техники является **конфокальная микроскопия**. Она широко используется в клеточной биологии и позволяет изучить структуры клеток и их органоидов благодаря своему высокому разрешению и контрасту, например: цитоскелет, ядро, хромосомы, или даже локализацию в них отдельных генов.

Современные методы исследования позволяют после записи в памяти компьютера серии оптических срезов провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов. Кроме того, конфокальная микроскопия позволяет исследовать динамические процессы, происходящие в живых клетках, например, движение ионов кальция и других веществ через клеточные мембраны.

Новыми перспективными направлениями являются методики FRAP (восстановление флуоресценции после фотовыжигания) и FRET (передача энергии посредством флуоресцентного резонанса). Данные методы применяются для исследования подвижности биоорганических молекул, а также для определения расстояния между молекулами разных типов, их окружения и взаимодействия.

Большинство современных конфокальных микроскопов построено на базе люминесцентного микроскопа. Следовательно, объекты исследования должны быть предварительно окрашены соответствующим люминесцентным красителем или обладать собственной флуоресценцией. Конфокальный микроскоп предназначен прежде всего для усиления контраста изображения; принцип его работы основан на использовании лазерного осветителя, высокочувствительного фотоприемника и компьютерной обработки изображения.

Разрешающая способность конфокального микроскопа – его важнейший параметр. Это минимальное расстояние между двумя точками, при котором прибор может различать их как отдельные структуры. Теоретически разрешающая способность конфокального микроскопа в 1,4 раза выше обычного.

Она зависит прежде всего от длины волны излучения, поэтому существует предел, накладываемый волновыми свойствами света. Поскольку конфокальный микроскоп – прибор оптико-электронный, то его разрешающая способность зависит не только от оптических узлов, но и от электронных систем преобразования оптического сигнала в электрический, а затем в цифровой. Конфокальный микроскоп позволяет рассмотреть структуры размером от 1-2 мкм до 0,2 мкм. Для изучения более мелких объектов придется применять другие методы, например, электронную микроскопию.



*Рис. 10. Конфокальный микроскоп*

**Электронная микроскопия.** Создание электронного микроскопа основано на возможности магнитного поля, обладающего магнитной симметрией подобно линзам, фокусировать поток электронов (Буш, 1926). В связи с тем, что длина волны электромагнитного колебания при движении электронов ( $\approx 0.0056$ ) короче длины волны видимого света (200-800 нм), разрешающая сила электронного микроскопа во много раз больше, чем у световых микроскопов. Полностью реализовать возможности электронного луча невозможно в связи с техническими затруднениями, однако уже сейчас разрешающая способность электронного микроскопа равна  $1/2 - 1/4$  нм.





а



б

Рис. 11. А) Первый электронный микроскоп.  
Б) Современный электронный микроскоп

Отечественные электронные микроскопы ЭММА-10 К имеют разрешающую способность 0,5 нм, а ЭНМ-100 Л-0,25 нм. Электронный микроскоп построен



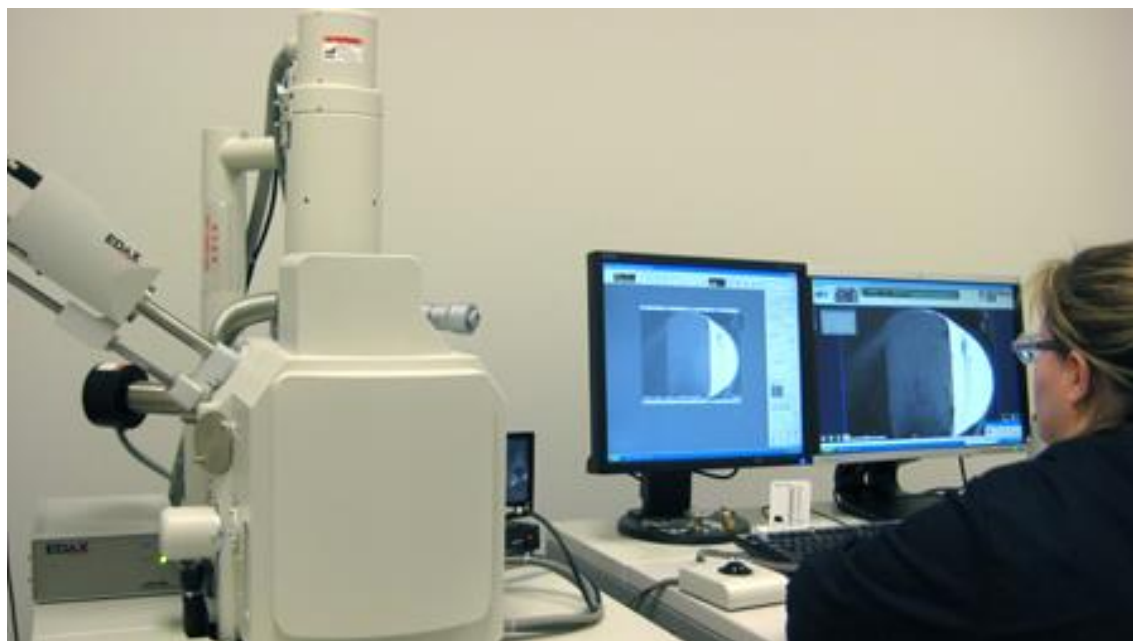
Рис. 12. Современный школьный микроскоп.

Модели микроскопов проделали путь от микроскопа Янсена, Дребеля, Гука — до современного электронного микроскопа.

Электронный микроскоп устроен следующим образом: 1. Источник электронов (по типу электронной пушки). 2. Система электромагнитных конденсоров. 3. Держатель образца (исследуемого объекта). 4. Электронный объектив (система электромагнитов). 5. Система электронных проекторов. 6. Флуоресцентный экран для визуального наблюдения. 7. Камера для фоторегистрации изображения. Вся система электронного микроскопа работает в глубоком вакууме. В отличие от светового микроскопа, в котором изображение определяется в связи с поглощением света, в электронном микроскопе флуоресценция экрана и воспроизведение деталей объекта зависят от степени рассеивания электронов при прохождении через изучаемый объект. Препараты для электронного микроскопа должны быть тонкими (0,5-2,0 нм). Готовятся они на специальном ультратоме УМВБ-2 и других моделях.

**Сканирующая электронная микроскопия.** Применение сканирующей (растровой) электронной микроскопии (СЭМ) позволяет провести:

- Фрактографические исследования структуры поверхности излома образцов.
- Исследования микроструктур и микротекстур.
- Анализ элементного состава фаз и поверхностных слоев образцов.



*Рис. 13. Сканирующий электронный микроскоп*

Сканирующая электронная микроскопия является разновидностью электронной микроскопии, в которой для зондирования исследуемой поверхности используется сканирование по ней сфокусированного пучка электронов. Для формирования изображения используется детектирование различных сигналов, включая вторичные электроны, обратно рассеянные электроны, рентгеновское

излучение и ток через образец. Двумерная карта снимаемого сигнала и представляет собой изображение поверхности.

В сканирующем электронном микроскопе пучок электронов с первичной энергией  $\sim 1-10$  кэВ фокусируется системой линз в пятно диаметром  $1-10$  нм на поверхности исследуемого образца. Сфокусированный пучок сканируется по поверхности с помощью системы отклоняющих катушек синхронно с электронным пучком в видеотрубке, которая используется в качестве оптического дисплея. Оба электронных пучка управляются одним и тем же генератором сканирования, поэтому увеличение просто равно отношению размеров дисплея и сканируемой области на поверхности образца. В сканирующем электронном микроскопе используется детектирование различных сигналов, включая вторичные электроны, обратно рассеянные электроны, рентгеновское излучение и ток через исследуемый образец. Основные применения сканирующей электронной микроскопии – визуализация топографии поверхности (при регистрации вторичных электронов) и карты распределения элементов на поверхности (при регистрации обратно рассеянных электронов, оже-электронов и рентгеновского излучения).

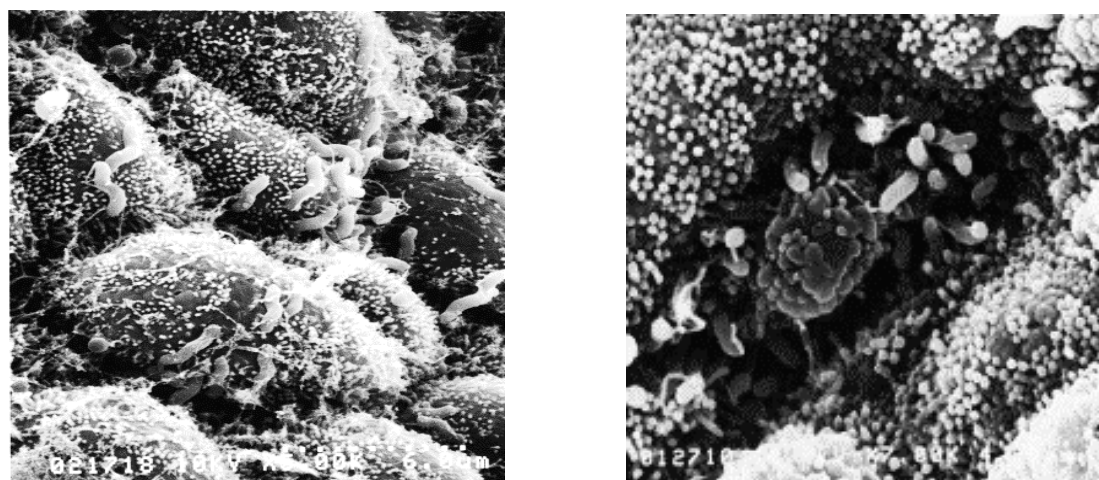


Рис. 14. *Helicobacter pylori* на поверхности эпителиоцитов желудка.  
Сканограммы. (Фото Рева Г.В., Рева И.В., Ямамото Т.)

В последние годы широко используются иммуноцитохимические и гистохимические методы исследования, целью которых является изучение химического состава тканей и клеток при сохранении их структуры, а также установление локализации химических веществ в определенных компонентах тканей, типах клеток и клеточных структурах. Имеющиеся в арсенале современной науки гистохимические реакции охватывают методы для выявления белков и аминокислот, нуклеиновых кислот, липидов, биогенных аминов, неорганических веществ, ферментов и т. д.

Время лабораторного занятия: 3 часа

### Хронокарта:

1	Организационная часть с мотивацией темы	5 мин
2	Программированный контроль	10 мин
3	Опрос-беседа	35 мин
4	Объяснение препаратов	10 мин
5	Перерыв	15 мин
6	Контроль за самостоятельной работой студентов. Помощь в работе с препаратами	65 мин
7	Подведение итогов. Проверка альбомов	10 мин

**Мотивационная характеристика темы:** Развитие гистологии как науки и её дальнейший прогресс тесно связаны с совершенствованием методов исследования. Гистология располагает большим арсеналом средств для изучения биологических структур на всех уровнях их организации: клеточном, тканевом, органном. Методы исследования, применяемые гистологией необходимы врачу любого профиля для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, познания причин, вызывающих болезни и осложнения их течения.

Материалы темы «Гистологическая техника» способствуют активному формированию мировоззрения будущего врача. Взаимоотношения между структурой и функцией рассматриваются с позиции диалектического представления о единстве материи и её движения; нет структуры без функции и нет функции без структуры. Структура является материальным субстратом любой функции организма. Необходимо отметить, что прогресс современной гистологии в большей степени определяется тем, что она основывается на достижениях физики, химии, математики и информационных технологий. Внедрение новейших методов исследования обуславливает бурное развитие биологических наук, в том числе гистологии, обеспечивает широкое внедрение гистологии в клинические дисциплины.

### Учебная цель

**Общая цель** – Знать общие принципы микроскопических методов исследования. Уметь работать на световом микроскопе.

**Конкретная цель** – 1. Знать принципы работы и овладеть навыками работы на световом микроскопе. 2. Знать принципы работы поляризационной микроскопии. 3. Знать принципы работы фазовоконтрастной микроскопии. 4. Знать принципы работы интерференционной микроскопии. 5. Знать принципы работы флуоресцентной микроскопии. 6. Знать принципы работы электронной микроскопии. 7. Иметь представление о гистологических и гистохимических



методах исследования. 8. Иметь представление о количественном методе исследования.

### **Необходимый исходный уровень знаний**

#### **Из других предметов и предшествующих тем:**

1. История развития микроскопической техники.
2. Физические свойства световой, люминесцентной, электронной микроскопии.
3. Химические свойства кислотных и щелочных растворов.
4. Знать устройство и правила работы с световыми микроскопами: «Биолам», «Эрудит», «МБР-1», «МБИ»

### **Вопросы для самоподготовки**

1. Назвать основные части светового микроскопа.
2. Что такое разрешающая способность микроскопа.
3. Правила работы с микроскопом.
4. Что такое тёмнопольная микроскопия и её применение при исследовании объектов.
5. Каковы возможности и принципы работы фазовоконтрастной и интерференционной микроскопии в изучении биологических объектов.
6. Конфокальный микроскоп, его возможности.
7. Люминесцентная микроскопия. Первичная и вторичная флуоресценция.
8. Принципы работы трансмиссионного электронного микроскопа. Его разрешающая способность.
9. Сканирующая электронная микроскопия.
10. Гистологические и гистохимические методы исследования.
11. Количественные методы гистологического исследования.

### **Рекомендации для работы на занятии**

#### **Задание 1. Овладеть правилами работы со световым микроскопом.**

**Объект изучения** – микроскоп фирмы ZEISS и web-камера с программным обеспечением. Знать принцип работы микроскопа «Биолам», «Эрудит», «МБР-1».

**Программа действий** – Научиться микроскопировать при малом и большом увеличении объектива.

**Ориентировочные основы действий** – Прежде, чем начать работу с микроскопом, нужно установить его на рабочем месте так, чтобы он был обращен колонкой к наблюдателю, а зеркалом к источнику света. Затем установить освещение при слабом увеличении объектива, повернув зеркало так, чтобы поле зрения микроскопа было освещено равномерно и достаточно ярко, но чтобы свет не раздражал глаз. После этого положить препарат на предметный столик

покровным стеклом кверху, чтобы объектив приходился против отверстия столика. Микроскопирование препарата всегда надо начинать при слабом увеличении, глядя сбоку на микроскоп, нужно опустить его тубус, вращая от себя макровинт до тех пор, пока фронтальная линия объектива не будет на расстоянии 0,5 см от покровного стекла. Затем, смотря в окуляр левым глазом и, держа при этом правый глаз открытым, медленно вращать макровинт на себя до получения изображения препарата. Для более четкой наводки пользуются микровинтом, вращая его не более, чем на пол-оборота в обоих направлениях. С помощью микровинта можно определить толщину препарата в мкм. Изучая препарат при слабом увеличении микроскопа, нельзя ограничиваться одним полем зрения – необходимо исследовать препарат по всей его поверхности, т.к. заключенный под покровное стекло гистологический срез может лежать не совсем горизонтально, и толщина его частей может быть разной, при его перемещении теряется четкость изображения. Поэтому нужно, передвигая препарат держать свободную руку на макровинте и слегка вращать его. Но при этом нужно помнить, что микроскоп дает обратное изображение, т.е. при перемещении препарата сверху вниз изображение будет двигаться снизу вверх. После того, как найдено на препарате хорошее место дальнейшего изучения, необходимо поставить его в центре поля зрения и закрепить препарат зажимами. После этого сменить увеличение на сильное: поднять тубус микроскопа при помощи поворота микровинта на себя, сменить объектив слабого на объектив сильного увеличения поворотом револьвера. Глядя сбоку на микроскоп, вращают микровинт от себя до тех пор, пока фронтальная линза не приблизится вплотную к покровному стеклу. После этого, глядя в окуляр, осторожно вращать микровинт на себя до появления четкого изображения препарата. Наиболее четкая наводка на фокус достигается вращением микровинта так же, как и при слабом увеличении. После окончания микроскопирования нельзя сразу снимать препарат с предметного стекла, нужно предварительно поднять тубус несколькими оборотами макровинта, иначе можно повредить препаратом фронтальную линзу. Затем приводят микроскоп в исходное состояние, т.е. ставят над отверстием столика объектив слабого увеличения на расстоянии 2-3 см. от него. Переноса микроскоп, держат правой рукой колонку штатива, а левую подставляют под его основание. С помощью оптических микроскопов можно изучать биологические объекты при различном увеличении. Увеличение до 440 х дают «сухие» объекты, т.е. те, при работе с которыми между препаратом и объективом имеется небольшое пространство (воздух), большое увеличение достигается с помощью короткофокусных объективов, когда между объективом и исследуемым препаратом помещают каплю жидкости (вода, масло). Эта система называется иммерсионной. В зависимости от применяемой жидкости различа-

ют масляную или водную иммерсию. Иммерсионная система позволяет изучать препараты с увеличением в 1200-1500 раз. Оптические микроскопы обладают ограниченными данными, в связи с чем, в гистологию введены новые методы микроскопии.

### **Техническое обеспечение учебного процесса**

1. Тестовый исходный контроль с использованием пакета компьютерных программ. 2. Обеспечение иллюстративной части занятия наглядными пособиями (стенды, таблицы, электроннограммы) с использованием мультимедиа (Multimedia Projector DV – thenter). 3. Микроскопы фирмы ZEISS и web-камера с программным обеспечением. 4. Наборы учебных и демонстрационных препаратов.

**Домашнее задание:** см. Учебно-методическую разработку лабораторного занятия для студентов **по теме: «Приготовление постоянного гистологического препарата».**

## ТЕМА 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСТОЯННОГО ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

### Краткое содержание темы

Этапы приготовления постоянного гистологического препарата.

Постоянный гистологический препарат – это изготовленный из тканей и органов объект, позволяющий узнать их структуру с помощью микроскопирования. Он может представлять собой тонкий срез органов, тотальный препарат (мягкая мозговая оболочка, рыхлая соединительная ткань), мазок (красный костный мозг, кровь и пунктат органа), отпечаток органов (печень, селезёнка). Обработка объектов для приготовления из него постоянного гистологического препарата включает следующие моменты: (1) взятие материала, (2) фиксирование, (3) обезвоживание и уплотнение, (4) заливка в плотные среды, (5) изготовление срезов, (6) окрашивание, (7) просветление и заключение в среду, служащую для сохранения препаратов.

**Взятие материала:** В клинике используют несколько способов взятия биопсийного материала: открытый, пункционный, аспирационный, эндоскопический, трепанобиопсия. Кроме того, важное значение имеет цитологический метод (мазки, отпечатки и т.д.), связанный с минимальной травмой при взятии материала и возможностью проведения исследования в экстренном порядке. Гистологические и цитологические методы взаимно дополняют друг друга.

Объекты, подлежащие исследованию, забираются как можно раньше после забоя животного и сразу же фиксируются или замораживаются для сохранения структуры органов. В некоторых случаях пользуются иссечением тканей из живого организма (биопсия) с целью диагностического морфологического исследования. Иссечение кусочков проводится острым инструментом (бритвы, секционные ножи) во избежание повреждения тканей. Ножницами пользуются при иссечении оболочек (сальник, мягкая мозговая оболочка) и тонкостенных полых органов (желчный пузырь, кишечник). Кусочки из костей выпиливают, иссекают с учетом микроскопического строения того или иного органа или тканей величиной 1-1,5 см<sup>3</sup>; например почки и надпочечник вырезают с таким расчетом, чтобы в них попали корковое и мозговое вещество, для чего разрезы ведут перпендикулярно поверхности органов. Из органов, имеющих во всех частях одинаковое строение (печень, селезёнка) объекты можно иссекать в любом участке, но желательно с капсулой. Кусочки из патологически изменённых тканей (опухоли, язвы) вырезают на границе с нормальными тканями так, чтобы были захвачены и нормальные, и изменённые участки.

**Фиксация.** Цель фиксации – закрепление и сохранение тканевых структур в том виде, в котором они находились в момент забора материала. Это до-

стигается коагуляцией белков фиксирующими жидкостями, которые должны достаточно быстро проникать в ткани и действовать "мягко", не вызывая грубых нарушений тканевых структур (например сморщивание, чрезмерное уплотнение). К фиксирующим жидкостям относят формалин, спирт, слабые растворы уксусной, азотной, хромовой и др. кислот, сулему, двуххромовокислый калий. Фиксаторы, состоящие из какого-либо одного вещества называются простыми фиксаторами. Чаще применяются сложные фиксаторы, состоящие из смеси нескольких простых фиксирующих компонентов. Так, например, раствор Буэна включает уксусную, пикриновую кислоты и формалин, жидкость Ценкера состоит из двуххромовокислого калия и сулемы, а жидкость Мюллера – это смесь двуххромовокислого калия, сульфата натрия в воде. Выбор фиксатора зависит от характера объекта и цели, которая ставится при изготовлении препарата. Например, чтобы сохранить в клетках включения жира, следует применять формалин, а не спирт, т.к. он является растворителем жира. В то же время этиловый спирт – наилучший фиксатор при исследовании в клетках железа, гликогена и нуклеиновых кислот. После фиксации кусочки промывают водой, если фиксатор содержит вещество, мешающее дальнейшей обработке (сулема, формалин). Если таких веществ нет (спирт или смеси, содержащие спирт), то кусочки не промываются.

**Обезвоживание. Уплотнение.** Обезвоживание исследуемого образца производят в спиртах возрастающей концентрации (50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°) с целью уплотнения ткани и подготовки ее к пропитыванию целлоидином или парафином. В каждом спирте исследуемый образец выдерживают не менее суток.

**Заливка.** Для того чтобы из кусочка можно было приготовить срез, необходимо придать ему еще более плотную консистенцию. Для этих целей применяются парафин и целлоидин. Принцип заливки заключается в последовательном проведении кусочка через ряд жидкостей, из которых каждая предыдущая должна обладать способностью смешиваться с последующей. Схема заливки в парафин состоит в следующем: 1. Спирт 100° – 1-2 часа; 2. Смесь 100° спирта и ксилола 1:1 – до погружения кусочка; 3. Ксиол (хлороформ) 1 час; 4. Раствор парафина в ксилоле – 0,5-1 час; 5. Расплавленный парафин (воск) 1-2 часа. Время каждого этапа заливки вместе с тем определяется особенностями объекта. После пребывания в расплавленном парафине в термостате при температуре 37°C – 1-2 часа или при 56°C 0,5-1 час, образец полностью пропитывается парафином. В целях полного освобождения объекта от ксилола кусочки проводят последовательно через 2-5 порций расплавленного парафина. Затем кусочек вместе с расплавленным парафином помещают в формочку, где он застывает при комнатной температуре в плотный блок.

Схема заливки в целлоидин состоит в последовательной проводке материала в 100° спирте, смеси спирта и эфира, 5% целлоидине. В каждом растворе

целлоидина образец выдерживают от 3 до 7 дней, после чего кусочек вследствие испарения спирта и эфира застывает в плотный гель. Это позволяет нарезать исследуемый образец с прилежащим целлоидином и наклеить его на деревянный брусок. Таким образом, парафиновые блоки могут сохраняться длительное время, а целлоидиновые помещают в 70° спирт для сохранения. Наряду с названными уплотняющими средствами, в настоящее время применяют синтетические смолы и полимеры (например, поливакс, карбовакс или полиэтиленгликоль).

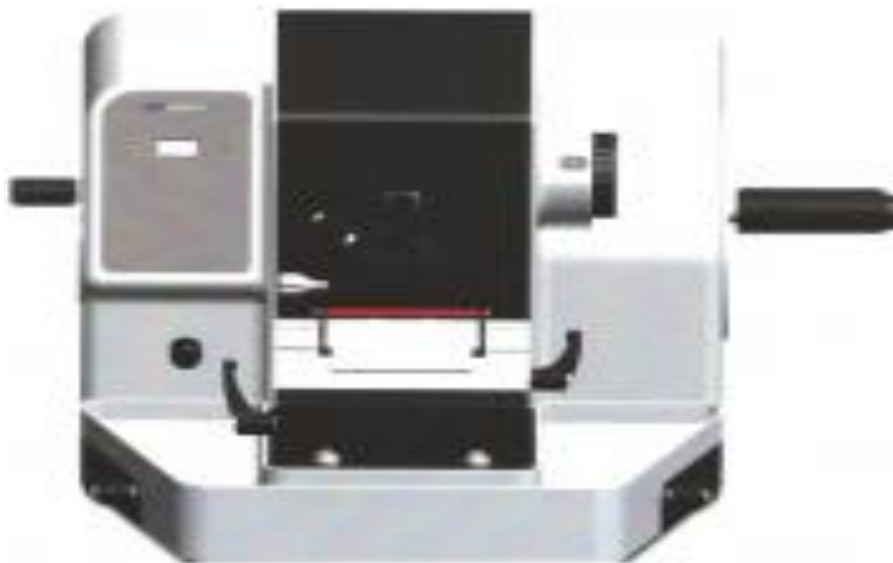
**Изготовление срезов.** Из залитых целлоидиновых и парафиновых блоков готовят срезы необходимой толщины (5-10мкм) на специальных приборах различной конструкции – микротомы. Наиболее распространённым является санный микротом (МС-2), в котором нож и объектодержатель движутся на специальных салазках.

**Основные части микротомы:** 1. Станина – массивная чугунная основа, на которую монтируются все остальные узлы. 2. Механизм подъема. 3. Зажим для блока. 4. Ножевые салазки, несущие на себе ножедержатель. Последний укрепляется на салазках рукояткой, позволяющей менять горизонтальный угол расположения ножа. Зажим снабжен подвижной цилиндрической втулкой, перемещение которой с помощью винта меняет угол наклона ножа. 5. Механизм микропередачи состоит из стержня соединённого с тягой храповика микровинта. Эта система поднимает столик с объективом на высоту, соответствующую толщине среза, а движущийся в горизонтальной плоскости нож режет блок.



*Рис. 13. Микротом РФМ (Германия). Санный микротом: толщина среза (1 – 40 мкм), размер образца (50х60 мм), ориентируемый держатель образца, вращаемый держатель ножа.*





*Рис. 14. Микротом PFM (Германия)*

Микротом: толщина среза (0,5-60 мкм), размер образца (45x50 мм), система ретракции – 40 мкм, LCD-дисплей.

<http://www.stormoff.ru/mikrotomy/>

При необходимости получения препарата в короткий срок (например, с диагностической целью) используется замораживающий микротом или криостат. Первый построен по санному принципу, но имеет особенности конструкции и монтажа. **Основные его узлы:** станина, механизм подъёма, бритводержатель и замораживающий столик. Криостат, в свою очередь, представляет собой холодильник, в рабочей камере которого установлен микротом. Сравнительно небольшой объём камеры, надежная теплоизоляция, наличие специального регулирующего механизма, позволяют поддерживать постоянно заданную минусовую температуру. Таким образом, уплотнение материала при резке на замораживающем микротоме и криостате достигается замораживанием образца.

**Окрашивание.** С тех пор, как было установлено, что отдельные составные части клеток, и межклеточные элементы по-разному воспринимают и удерживают красители, было предложено большое количество окрасок препаратов. Хотя до настоящего времени полностью не выяснена сущность механизмов действия многих красителей, несомненно, что в основе окрашивания микроструктур лежат физико-химические процессы. Из физических факторов следует отметить диффузию, адсорбцию (поверхностное впитывание) красителя, а также его растворимость, из химических – электролитические свойства красящих веществ в самих тканях. Немаловажное значение имеет плотность тканей и дисперсность самого красителя. Первое свойство определяет последователь-

ность окраски отдельных структур, второе – скорость процесса окраски. На электролитических свойствах основано разделение применяемых в гистологической практике красителей на три группы: основные, кислые и нейтральные. Основной краситель представляет собой красящее основание или его соль и окрашивает клеточные и тканевые структура кислой природы (например: хроматин, ядра, содержащие ДНК, ядрышко, содержащие РНК). Отсюда и термин – базофилия (любящий основание) для обозначения тканевых компонентов, окрашивающихся красителями, таким как тионин, гематоксилин, метиловый зелёный, кармин, азур, сафранин и др. Кислотный краситель – это красящая кислота и её соль, в силу чего она окрашивает вещества и частицы основной природы, например гранулы эозинофильных лейкоцитов, цитоплазму большинства клеток. Отсюда оксифиллен для тканевых элементов, красящихся кислотными красителями, к которым относятся эозин, кислый фуксин, конго красный, анилиновый синий и др. Нейтральный краситель образуется при соединении водных растворов кислотного и основного красителя, например судан – 3, эозиновокислый метиленовый синий. Кроме того, в гистологической практике часто используются специальные красители. Так, например, для выявления жира применяется судан-3 и шарлах красный. Первый окрашивает жир в желтый, а второй – в оранжевый цвет. Осмиевая кислота окрашивает жиры в черный цвет. Эластические волокна при обработке орсеином окрашиваются в коричневый цвет, резорцин фуксином в темносиний цвет, а пикрофуксин окрашивает их в желтый цвет. Для выявления нервных элементов, клеточных границ и органоидов в различных тканях применяется импрегнация (пропитывание) раствором азотистокислого серебра, осмиевой кислоты, хлорного золота, основанная на восстановлении свободных металлов и осаждении их на исследуемых структурах.

**Просветление и заключение.** Сохранение прозрачности, окраска и структурная целостность постоянного гистологического препарата обеспечивается просветлением и заключением препарата в специальные среды. Средой для заключения служат смола канадской основы (канадский бальзам) и пихтовая смола, употребляющиеся в виде густых растворов этих смол в ксилоле. Применение их при предварительном обезвоживании абсолютным спиртом и просветлении ксилолом. При отсутствии смол можно пользоваться дамарным лаком (60% раствор смолы деревьев рода произрастающих в Индии) или раствором канифоли в спирте, который получают из различных видов сосны. В тех случаях, когда по условиям обработки препарат не может соприкасаться со спиртом, ксилолом и т.п. (например окраски на жиры) его заключают в среду (глицерин, глицерин-желатин), которые, кроме того, обладают просветляющими свойствами. Например, широко распространенными методами окраски препаратов является окраска гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

Особенности методики приготовления постоянных гистологических препаратов некоторых органов и тканей:

**I. Обработка и окрашивание костной ткани.** Наличие в межклеточном веществе костной ткани солей кальция придаёт ей твёрдость, затрудняющую приготовление препаратов. Поэтому обработка костной ткани включает приготовление срезов после специальной предварительной подготовки объекта – декальцинацией в водном растворе азотной кислоты 5-7% концентрации, кроме того, одним из способов получения препаратов из костной ткани является приготовление тонких костных пластинок (шлифов) из клубочков нефиксированной костной ткани путём стачивания последних. Наиболее распространенным методом окраски срезов декальцинированной кости является окраска по Шморлю (тионином с пикриновой кислотой), после чего общий фон срезов приобретает коричневый или болотный цвет, а костные клетки и их отростки окрашиваются в красный.

**II. Приготовление тотальных препаратов.** В тех случаях, когда необходимо изучить микроскопическую структуру объекта, имеющего пленочное строение (серозные, мозговые оболочки), готовят целостные тотальные препараты. Для этого участок пленки во избежание складок расправляют и фиксируют на ровной поверхности. По окончании фиксации материал обрабатывают обычным способом или, если объект сам по себе достаточно тонок и имеет естественную окраску, то можно ограничиться лишь фиксацией, просветлением и заключением его (например, при выявлении пигментных клеток твёрдой и мягкой мозговых оболочек) или фиксацией, окрашиванием (препарат мелких сосудов мягкой мозговой оболочки).

**III. Гистологические препараты для пунктатов органов.** Диагностическая пункция (взятия материала с помощью специальных игл) всё больше входит в гистологическую практику. Гистологические препараты из пунктата обладают преимуществом перед мазками, поскольку они позволяют изучить структуру нормальной и патологически измененной ткани. Пунктат смешивают в чашке Петри с раствором лимоннокислого натрия для предупреждения свёртывания крови. После кратковременного стояния жидкое содержимое сливают, а осевшие плавающие частички собирают на полоску фильтровальной бумаги. Эту процедуру проводят несколько раз. Собранный материал вместе с фильтровальной бумагой фиксируют в зависимости от взятого органа (например, печень в 10% формалине, костный мозг в жидкости Ценкера) и по окончании фиксации – промывка в проточной воде, проводят через спирты и заключают в парафин, предварительно отделив фильтровальную бумагу. Окраска производится в зависимости от цели исследования.

#### **IV. Приготовление и окраска мазков крови.**

Для морфологического исследования клеток крови и подсчета лейкоцитарной формулы готовят мазок крови. Он должен отвечать следующим условиям: 1. Начинаться на расстоянии 1 см от края предметного стекла и заканчиваться, не доходя до края противоположной стороны на 2-3 см. 2. Препарат должен быть равномерной толщины, а не волнообразным. 3. Слой крови не должен достигать краев стекла. В противном случае в мазке эритроциты будут лежать густым слоем, и образовывать монетные столбики, фиксируют метиловым (этиловым) 100° спиртом и окрашивают по методу Романовского-Гимза (азур-2 с эозином). Первый окрашивает базофильные структуры клеток в ярко-синий цвет, а эозин-оксифильные части в розово-красный.

Мазок крови человека. (г/э) (Фото Рева Г.В., Рева И.В.).

При самых различных заболеваниях кроветворного аппарата (лейкозы, анемии, новообразования и пр.), как правило, приходится прибегать к окраске азур-эозиновыми смесями; из них наиболее часто в патологистологической практике применяются краска Романовского-Гимза и азур II-эозин. Оба красителя по своему составу весьма сходны и процедура окрашивания ими одинакова. Для достижения хороших результатов основным и решающим моментом является свежесть материала. Погибшие или убитые экспериментальные животные должны быть вскрыты немедленно, а трупы умерших людей – по возможности не позднее 3–6 часов после смерти. Кроме того, следует строго соблюдать и целый ряд других условий:

Фиксация кусочков в ценкер-формоле; допускается и жидкость Орта как вполне полноценный в данном случае фиксатор. Можно получать неплохие результаты и после формалиновой фиксации, но при условии хромирования срезов и притом лучше в комбинации с сулемой. Декальцинированные объекты мало пригодны для гематологических исследований.

Срезы готовят максимально тонкие (5 мкм) и лучше всего парафиновые.

Для разведения красителей и промывания препаратов (срезов и мазков) берут свежую дистиллированную воду, сохраняемую под натронной известью. В день работы требуемое количество дистиллированной воды следует прокипятить в течение 3–5 минут, охладить и плотно закрыть. Оптимальный pH воды для гематологических окрасок – 6,8–7,0.

Посуда для красителей и дистиллированной воды должна быть безукоризненно чистой.

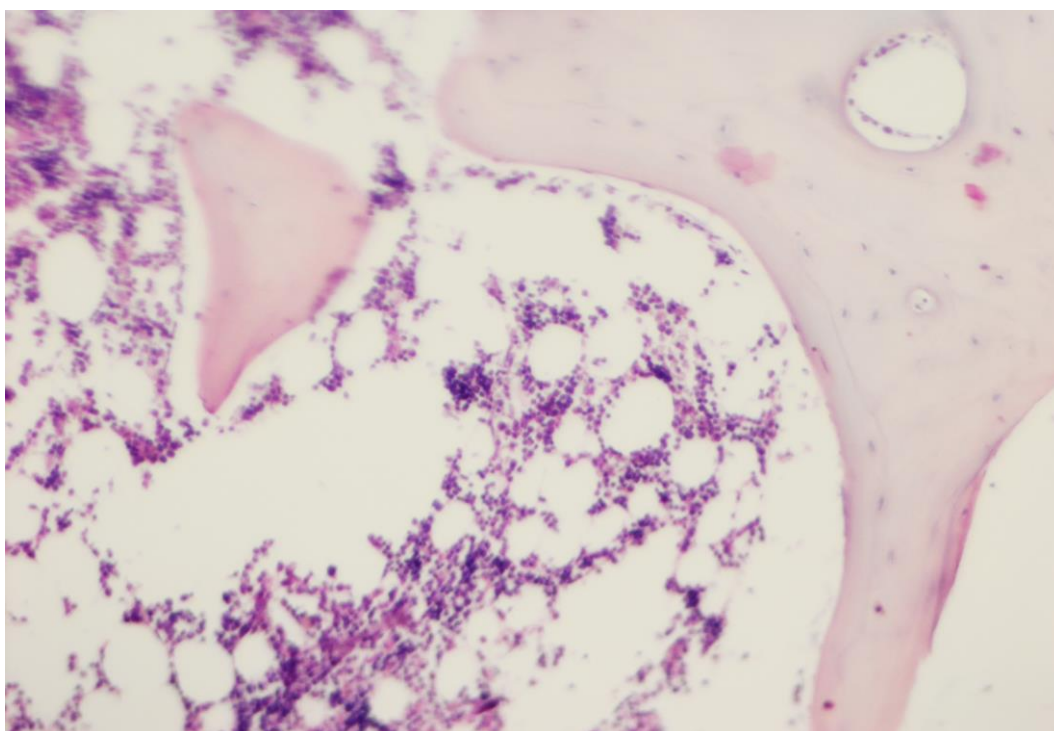
Красящие растворы готовят перед самым употреблением, нельзя допускать даже самого непродолжительного стояния их. Как во время приготовления красящего раствора, так и в момент выливания его на срезы не должно быть выпадения осадков. Образование осадков делает краску негодной и зависит ли-

бо от качества ее (что особенно надо иметь в виду в отношении краски Романовского–Гимза), либо от дистиллированной воды и, наконец, от посуды. Приготовленную красящую смесь нельзя лишний раз взбалтывать, не допускается даже передвигать посуду, в которой идет окрашивание; и то и другое способствует преждевременному выпадению красителя.

Окрашивание проводят в чашках Петри на стеклянных палочках или на обломках спичек срезами вниз. Можно окрашивать и в стаканчиках.

Во избежание преждевременного выцветания препаратов употребляют ксилол хорошего качества (не содержащий кислоты). Из различных сортов ксилола здесь может быть рекомендован орто-ксилол, как наиболее очищенный. По своей цене он значительно дороже обычного «чистого» ксилола, представляющего собой смесь трех изомеров (мета, орто, пара) с преимущественным содержанием м-ксилола.

Учитывая необходимость исследования с иммерсионной системой, пользуются тонкими покровными стеклами, не толще 0,17 мм.



*Рис. 15.* Препарат красный костный мозг. Декальцинация. Окраска г/э. Фото Рева И.В., Рева Г.В., Ямамото Т. Окраска по Романовскому – Гимза

Методика окраски. 1. Если материал был фиксирован в ценкер-формоле и осадки не были своевременно удалены в кусочках, то наклеенные на стекла срезы (депарафинированные) вначале освобождают от сулемовых осадков и после этого хорошо промывают в дистиллированной воде. Препараты помещают в чашки Петри или в стаканчики.

2. Готовят красящий раствор в градуированном цилиндре, примерно из расчета 1–2–3 капли краски Романовского–Гимза на 1 мл дистиллированной воды г. Цилиндр один раз переворачивают для размешивания раствора и краску выливают в чашки Петри на срезы. Проверяют, нет ли выпадения осадков, при неудаче готовят новую порцию краски (при этом посуду тщательно перемывают).

3. Срезы оставляют в краске при комнатной температуре на 18-24 часа, а в термостате при 37° -на 1-2 часа.

4. Основательно промывают в водопроводной воде. Срезы должны быть резко перекрашены, темно-синего цвета.

5. Дифференцируют в воде, подкисленной уксусной кислотой (из расчета 2-3 капли крепкой или ледяной уксусной кислоты на 200 мл воды) до тех пор, пока будут отходить грубые облачка синей краски (азур) и срез порозовеет. Обесцвечивание препарата идет быстро.

6. Основательно промывают в воде и доводят дифференцировку до конца одним чистым 96° спиртом, контролируя под микроскопом, пока отчетливо выделяются различные клеточные структуры. Хорошо дифференцированные срезы – бледно-синие с сиреневым оттенком.

7. Быстро проводят через абсолютный спирт, отжимают фильтровальной бумагой, просветляют ксилолом и заключают в бальзам. Применение абсолютного спирта необязательно.

Нельзя пользоваться карбол-ксилолом, креозотом и анилиновым маслом.

Можно употреблять эвкалиптовое, бергамотное и origановое масла, но их надо тщательно удалять ксилолом.

Краску Романовского-Гимза в готовом виде.

Окраска азур II-эозином

1. Срезы подготавливают так же, как и для окраски по способу Романовского–Гимза (см. пункт 1 метода Романовского-Гимза).

2. Готовят основные растворы из азура II и эозина (растворимого в воде), каждый из расчета 1 г на 1000 мл дистиллированной воды. Эти растворы довольно стойки и долго сохраняются (месяцами), но обязательно в темноте.

3. Непосредственно перед употреблением основные растворы красителей разводят дистиллированной водой следующим образом: берут 12 мл раствора эозина и доливают до 90 мл дистиллированной водой, а затем приливают 10 мл раствора азура II. Осторожно покачивая посуду, перемешивают смесь, получается раствор темно- фиолетового цвета. Готовую красящую смесь выливают на срезы. Следить за осадками.

4. Окрашивают в чашках Петри (на стеклянных палочках) или стаканчиках при комнатной температуре – 18–24 часа, а в термостате при 37° – 1–2 часа.



5. Промывают в водопроводной воде и дифференцируют как при окраске по способу Романовского–Гимза (см. пункты 5 и 6 метода Романовского–Гимза).

6. Быстро проводят через абсолютный спирт (необязательно), просветляют в ксилоле и заключают в бальзам.

Методика окраски капризная. Как уже было отмечено выше, успех в основном определяется качеством дистиллированной воды, употребляемой для приготовления красящих растворов.

Ввиду возможных неудач желательно одновременно пускать в работу побольше срезов.

Готовые препараты хранят в темноте.

При хорошем качестве красителей препараты сохраняются многими годами, в противном случае они постепенно обесцвечиваются.

### **Общие замечания**

Для приготовления мазков крови берут тщательно вымытые и обезжиренные предметные стекла. Каплю крови помещают на конец предметного стекла и размазывают ребром другого (шлифованного) стекла. Чтобы получить хороший мазок, узкое ребро шлифованного стекла ставят слева от капли, непосредственно соприкасаясь с ней, под углом в  $45^\circ$ . Выжидают, пока капля крови расплывется, и тогда легким быстрым движением справа налево размазывают каплю. Капля должна быть соответствующей величины, т. е. такой, чтобы при изготовлении мазка она была полностью и без остатка исчерпана. При всех манипуляциях, связанных с приготовлением мазка, предметные стекла следует держать только за ребра. Приготовленный мазок сушат, помахивая препаратом до момента исчезновения влажного блеска. Высохший мазок фиксируют в метиловом или чистом  $96^\circ$  спирте (в стаканчиках); в первом – 3–5 минут, во втором – 10–15 минут. По окончании фиксации препарат вынимают из спирта пинцетом, ставят вертикально на фильтровальную бумагу и ожидают испарения спирта.

Есть и другие очень хорошие способы окраски кровяных мазков, как, например, Май–Грюнвальда, Лейшмана, Паппенгейма, описание которых можно найти в различных курсах по микроскопической технике (С. П. Шуенинов, 1916; С. С. Вайль, 1947; Ромейс, 1953, и др.). В отношении результатов окраски все они сходны между собой и с краской Романовского–Гимза.

### **Окрашивание по Паппенгейму**

Предварительная фиксация мазков не требуется. На подсохшие на воздухе мазки наливают краску-фиксатор Мая –Грюнвальда на 3 мин. Не сливая краску, к ней добавляют такое же количество дистиллированной воды. Через 1 мин краску с мазка сливают и, не ополаскивая его, наливают профильтрован-

ный рабочий раствор (разведение 1:4) готовой краски Романовского – Гимзы (при pH 6,8) на 5 мин. После окрашивания препараты промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе, устанавливая вертикально в специальной сушке.

Для приготовления краски-фиксатора Мая–Грюнвальда 250 мг порошка Мая–Грюнвальда растворяют в 100 мл метилового спирта. Раствор подогревают при 70 °С на водяной бане до полного растворения порошка, фильтруют и хранят в бутылке с притертой пробкой.

#### **Окрашивание по Паппенгейму в модификации Н. Ю. Полонской**

Готовят 0,3% раствор красителя Мая–Грюнвальда (300 мг порошка красителя растворяют в 100 мл метилового спирта; раствор созревает 3 дня), раствор азура II (1 г растворяют в 1000 мл кипящей воды), раствор эозина калия или натрия (1 г эозина калия или 0,5 г эозина натрия растворяют в 1000 мл кипящей воды).

Высушенные мазки фиксируют в метиловом спирте 3 мин. Затем окрашивают 0,3% раствором Мая – Грюнвальда, на одну часть которого добавлено четыре части фосфатного буфера (pH 6,8 – 7,2), 10 мин. Докрашивают азурэозином (одна часть раствора азура на одну часть раствора эозина и 5 частей фосфатного буфера при pH 6,8 – 7,2) 20 мин. Смывают краситель проточной водой. Высушивают мазки на воздухе.

#### **Окрашивание мазков по Лейшману**

Готовят краску Лейшмана (2,5 г сухого красителя на 1 л метилового спирта; краситель созревает 3 – 4 дня), азур (1 г сухого красителя на 1 л дистиллированной воды, краситель созревает 3–4 недели); эозин (1 г сухого красителя на 1 л дистиллированной воды, краситель созревает 3-недели).

Высушенный на воздухе мазок переносят на 3 мин в краситель Лейшмана, промывают в водопроводной воде.

Удаляют (стряхивают) избыток воды и заливают красителем, в состав которого входят 40 мл азура, 30 мл эозина и 70 мл дистиллированной воды. Мазки окрашивают 30-40 мин. Промывают водопроводной водой. Высушивают на воздухе или промокают фильтровальной бумагой.

#### **Срочное окрашивание по Алексееву**

Тонкие мазки фиксируют в подогретом до 35–40 °С растворе Мая– Грюнвальда 30 с.

Ополаскивают в воде.

Окрашивают в 0,1 % растворе азур- эозина (2:1) 2 мин.

Ополаскивают в воде и высушивают, промокая.

#### **Окрашивание по Папаниколау и его модификации**

Влажный препарат фиксируют в смеси Никифорова в течение 30 мин.

Если после фиксации его залить глицерином на 2 ч, то потом препарат можно хранить до 14 дней.

Перед окрашиванием препарат проводят через спирты нисходящей концентрации (100%, 95%, 80%, 50%) и дистиллированную воду (в каждом стаканчике держат по 2 мин).

Окрашивают гематоксилином в течение 10 мин (перед использованием раствор красителя необходимо фильтровать).

Промывают в 3-х сменах дистиллированной воды.

Затем переносят в смесь из 97 мл 70 % спирта и 3 мл концентрированного раствора аммиака (препарат становится синим). В этой смеси препарат необходимо ополоснуть несколько раз.

Опускают в 70 % спирт и затем промывают в проточной воде.

Опускают в раствор карбоната лития на 1 мин (3 капли насыщенного водного раствора на 100 мл дистиллированной воды). Промывают в проточной воде 5 мин.

Обезвоживают (дистиллированной водой и спиртами восходящей концентрации – 50 %, 70 %, 80 %, 100 %).

Докрашивают в течение 4 мин в оранжевом G (готовый раствор).

Ополаскивают в двух сменах 95 % спирта.

Опускают в краситель Папаниколау на 1 – 2 мин.

Ополаскивают в трех сменах 95 % спирта и двух сменах 100 % спирта (в последней смене держат 5 мин).

Просветляют в ксилоле, заключают в бальзам.

Красители приготавливают следующим образом.

Раствор 1: 1 г кристаллического гематоксилина растворяют в 10 мл 100% спирта.

Раствор 2: 20 г алюмокалиевых квасцов при нагревании растворяют в 200 мл дистиллированной воды.

Через 24 ч растворы 1 и 2 смешивают и добавляют 0,5 г оксида ртути (красного), нагревают до кипения и охлаждают на водяной бане. Через 24 ч отфильтрованный раствор может быть использован. Каждый раз перед применением его следует фильтровать.

Краситель Папаниколау приготавливают следующим образом. Смешивают 45 мл 1,5 % раствора светлого зеленого (лихтгрюн) в 95 % спирте, 10 мл 0,5 % раствора основного коричневого (бисмаркбраун) в 95 % спирте, 45 мл 0,5 % раствора эозина в 85 % спирте, 0,2 г фосфорно-молибденовой кислоты и добавляют одну каплю насыщенного водного раствора карбоната лития (1 г на 100 мл дистиллированной воды).

Отечественные цитологи предлагают модификацию метода, в которой светлый зеленый заменен на более доступный бриллиантовый зеленый.

### **Окрашивание по Папаниколау в модификации Куницы**

Оранжевый G: смешивают раствор 0,5 г оранжевого G на 100 мл 96 % спирта и 0,015 г фосфорно-молибденовой кислоты. Полученный раствор оставляют на 1 сут, после чего он годен для использования.

Чтобы приготовить промежуточный краситель и бриллиантовый зеленый, необходимо за 1 сут приготовить следующие водные растворы:

основного коричневого – 0,1 г на 1 л дистиллированной воды;

эозина (желтого или обычного) – 0,1 г на 1 л дистиллированной воды;

бриллиантового зеленого – 0,05 г на 1 мл дистиллированной воды + 1 мл 96 % спирта.

Эти растворы необходимо плотно закрыть на 1 сут в термостате при 37°C. Далее на них готовят спиртовые растворы красителей.

Промежуточный краситель: основной коричневый – 1 мл водного раствора на 200 мл 96 % спирта (если эозин обычный – 1 мл водного раствора на 260 мл 96 % спирта). Для получения промежуточного красителя, представляющего собой смесь, берут следующие количества вещества на 100 мл смеси: 16 мл спиртового раствора основного коричневого, 84 мл спиртового раствора эозина (желтоватого или обычного), 0,17 г фосфорно-молибденовой кислоты и добавляют одну каплю насыщенного раствора карбоната лития.

Красители фильтруют перед смешиванием, остаток хранят непрофильрованным.

Бриллиантовый зеленый: 0,5 мл водно-спиртового раствора на 180 мл 96% спирта.

Препарат фиксируют в смеси Никифорова (минимальная продолжительность фиксации – 30 мин).

Промывают в 96 % спирте, а затем дистиллированной воде.

Окрашивают гематоксилином 2 – 3 мин, промывают в воде.

Дифференцируют 0,5 % раствором соляной кислоты до покраснения в течение 2 – 3 мин, сливают, промывают в воде. Контролируют под микроскопом окраску ядер.

Опускают на 1 мин в слабый раствор карбоната лития (три капли насыщенного водного раствора лития на 100 мл дистиллированной воды), промывают в воде.

Тщательно обезвоживают мазок 96 % спиртом.

Окрашивают оранжевым G в течение 1 мин, наливая краситель на стекло. Сливают краситель и хорошо промывают спиртом до удаления его избытка.

Красят промежуточным красителем 1 мин, сливают, промывают в спирте.

Окрашивают бриллиантовым зеленым 1 – 2 мин, сливают, промывают спиртом, промокают.

Проводят через ксилол, заключают в бальзам.

### **Окрашивание по Папаниколау в модификации Руденко**

Вначале готовят водные растворы цитоплазматических красок: по 0,1 г светлого зеленого, эозина желтоватого водорастворимого и основного коричневого растворяют отдельно в 1 мл воды. Водные растворы, хорошо закрыв, оставляют на 1 сут в термостате при 37 °С. Затем из водных растворов готовят спиртовые растворы красителей:

светлый зеленый – 1 мл водного раствора на 200 мл 96 % спирта;

эозин желтоватый водорастворимый – 1 мл водного раствора на 200 мл 96 % спирта;

основной коричневый – 0,25 мл водного раствора на 200 мл 96 % спирта.

После этого готовят смесь, которую Г. Папаниколау назвал ЕА-36. Она состоит из смеси спиртовых растворов красителей: 200 мл светлого зеленого, 168 мл эозина желтоватого и 32 мл основного коричневого, которые перед смешиванием фильтруют. К смеси добавляют 0,68 – 0,8 г фосфорно-молибденовой кислоты и четыре капли насыщенного водного раствора карбоната лития.

В растворе красителя образуется небольшое количество устойчивого осадка, не мешающего работе. Полной готовности краска достигает через 3–12 дней при комнатной температуре.

Для приготовления оранжевого G 0,5 г сухого вещества растворяют в 100 мл 96 % спирта и добавляют 0,02 – 0,05 г фосфорно-молибденовой кислоты. Полученный насыщенный раствор готов к применению на следующий день. После того как использован весь раствор красителя, в эту же посуду с осадком можно добавить 100 мл 96 % спирта и указанное количество фосфорно-молибденовой кислоты. Оставшиеся количества спиртовых растворов эозина желтоватого и основного коричневого хранят и используют для приготовления красителя 3 – 6 мес.

Мазки фиксируют в жидкости Никифорова 30 мин.

Промывают в 96 % спирте 1 мин, затем в дистиллированной воде 2 – 3 мин.

Окрашивают в растворе гематоксилина 3 – 8 мин.

Ополаскивают в проточной воде 3 – 5 мин.

Проводят через 0,5 % раствор соляной кислоты 1 мин.

Промывают 2 – 3 мин в дистиллированной воде и 3 – 5 мин – в проточной, контролируя процесс под микроскопом.

Переносят в 0,1 % раствор карбоната лития на 1 мин.

Ополаскивают в дистиллированной воде и 96 % спирте.

Переносят в 100 % спирт на 1 мин.

Окрашивают в растворе оранжевого G 1 – 3 мин.

Проводят через 96 % спирт в течение 2 мин, контролируя процесс под микроскопом.

Окрашивают в светлом зеленом (смесь ЕА-36) 2 мин.

Проводят через 96 % спирт 1 – 3 мин.

Промокают фильтровальной бумагой, проводят через ксилол, заключают в бальзам.

Применяют следующий вариант окрашивания гематоксилином и эозином для мазков.

Для приготовления красителя 50 г алюмокалиевых квасцов растворяют в 500 мл дистиллированной воды, доводят до кипения и высыпают в горячий раствор 1 г гематоксилина. Затем добавляют 500 мл дистиллированной воды и доводят до кипения (но не кипятят). Раствор остужают до комнатной температуры и добавляют йодат калия. Горло сосуда завязывают марлей и оставляют созреть на свету 5 недель. Затем сосуд с красителем закупоривают и убирают в темное место. Перед использованием краситель фильтруют.

Мазки фиксируют в смеси равных частей эфира и 96 % спирта или в 96 % спирте 7–10 мин.

Окрашивают в гематоксилине 5 мин.

Промывают в проточной воде 1 – 2 мин.

Окрашивают в 0,3% спиртовом растворе желтоватого эозина 1 мин.

Промывают в проточной воде 1 – 2 мин.

Высушивают.

Совершенствование методов диагностики и развитие гистологической техники направлены на уменьшение продолжительности приготовления качественных препаратов с целью обеспечения быстрого и точного установления диагноза. Если раньше результаты микроскопического исследования и ответ на биопсию можно было получить через 4–5 сут от момента поступления материала, то теперь продолжительность исследования уменьшилась до 1 сут, а при четко организованной работе и наличии современного оснащения весь процесс можно завершить за несколько часов.



Время лабораторного занятия: 3 часа.

**Хронокарта:**

1	Организационная часть с мотивацией темы	5 мин
2	Программированный контроль	10 мин
3	Опрос-беседа	35 мин
4	Объяснение препаратов	10 мин
5	Перерыв	15 мин
6	Контроль за самостоятельной работой студентов. Помощь в работе с препаратами	65 мин
7	Подведение итогов. Проверка альбомов	10 мин

**Мотивационная характеристика темы:** Развитие гистологии как науки и её дальнейший прогресс тесно связаны с совершенствованием методов исследования. Гистология располагает большим арсеналом средств для изучения биологических структур на всех уровнях их организации: клеточном, тканевом, органном. Методы исследования, применяемые гистологией необходимы врачу любого профиля для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, познания причин, вызывающих болезни и осложнения их течения.

Материалы темы «Гистологическая техника» способствуют активному формированию мировоззрения будущего врача. Взаимоотношения между структурой и функцией рассматриваются с позиции диалектического представления о единстве материи и её движения; нет структуры без функции и нет функции без структуры. Структура является материальным субстратом любой функции организма. Необходимо отметить, что прогресс современной гистологии в большей степени определяется тем, что она основывается на достижениях физики, химии, математики и информационных технологий. Внедрение новейших методов исследования обусловило бурное развитие биологических наук, в том числе гистологии, обеспечивает широкое внедрение гистологии в клинические дисциплины.

**Учебная цель**

**Общая цель** – Знать содержание предмета и общебиологические основы гистологии. Уметь приготовить постоянный гистологический препарат.

**Конкретная цель** – 1. Знать цели и задачи гистологии, цитологии и эмбриологии. 2. Иметь представление о вкладе отечественных учёных в развитие гистологии. 3. Современное представление о клеточной теории. 4. Знать основные этапы приготовления постоянного гистологического препарата.

Необходимый исходный уровень знаний

**Из других предметов и предшествующих тем:**

1. Свойства химических веществ.
2. Правила работы со световым микроскопом.
3. Правила работы с кислотами и щелочами.

**Из темы текущего занятия:**

1. Предмет и задачи гистологии.
2. Клеточная теория.

3. Гистологические классические методы окрашивания. Методика окраски гематоксилин-эозином, по Романовскому-Гимзе и по Ван-Гизону. Методика окрашивания по Папаниколау и её модификации. Гистохимические и иммуногистохимические методы окрашивания.

### **Вопросы для самоподготовки**

1. Гистология как наука, ее признаки.
2. Гистология как учебная дисциплина, ее основные разделы.
3. Исторические этапы развития гистологии.
4. Клеточная теория и её современная трактовка.
5. Основные этапы приготовления постоянного гистологического препарата.

**Задание 1. Окрасить целлоидиновые срезы методом гематоксилин-эозином.**

**Объект изучения** – Целлоидиновые срезы органов.

**Ориентировочные основы действий** – 1. Срезы из дистиллированной воды переносят в раствор гематоксилина на 2-5 мин. Окрашенные срезы дифференцируют в проточной воде 10-15 мин. Затем их переносят в дистиллированную воду, после чего окрашивают эозином 3-5 мин и быстро споласкивают дистиллированной водой. Обезвоживают 96° спиртом (быстро). Просветляют в карбол-ксилоле в течение 2-3 мин. и заключают в бальзам.

**Задание 2. Окрасить целлоидиновые срезы методом по Ван-Гизону.**

**Объект изучения** – Целлоидиновые срезы органов.

**Ориентировочные основы действий** – Срезы из дистиллированной воды переносят в раствор гематоксилина на 2-5 мин. Затем срезы помещают в проточную воду на 10 мин. Затем срезы переносят из проточной воды в дистиллированную воду, а затем – в раствор пикрофуксина на 3-5 мин. Быстро споласкивают дистиллированной водой. Проводят через 96° спирт (быстро). Просветляют в скипидаре, карбол-ксилоле в течение 2-3 мин. Заключают в бальзам, затем покрывают стеклом.

### **Задание 3. Окрасить срезы методом по Романовскому-Гимзе.**

**Объект изучения** – Целлоидиновые срезы органов.

**Оrientировочные основы действий** – Окрашивание по Романовскому –

**Гимзе** – цитологический метод окрашивания микроорганизмов, клеточных структур и тканей различных видов (в том числе крови) для изучения методом световой микроскопии. Предложена в 1904<sup>[1]</sup> году Густавом Гимзой. В авторской версии название красителя – «Giemsasche Lösung für die Romanowsky färbung» (Раствор Гимзы для окраски по Романовскому)<sup>[2]</sup>. Окрашивает ацидофильные образования в различные оттенки красного цвета, базофильные – в цвета от пурпурного до синего. Готовый жидкий краситель перед окрашиванием мазков разводят из расчета 1-2 капли красителя на 1 мл дистиллированной воды. Мазки окрашивают 20 – 25 минут при 37 °С во влажной камере (закрытая чашка Петри с увлажнённым фильтром на дне). После окрашивания мазки промывают в проточной воде, сушат на воздухе и исследуют при масляной иммерсии.

Красящую смесь Романовского-Гимзы, которая имеет в основе краску Романовского-Райта, в виде порошка (коммерческий краситель) растворяют в смеси равных объемов метилового спирта и глицерина (800 мг красителя на 100 мл растворителя). Краситель растворяется плохо, поэтому лучше его растереть с растворителем в количестве 300 мг на 100 мл, а затем, помешивая, добавлять краситель до получения нужной концентрации. Приготовление красителя часто занимает несколько дней. Важно в качестве растворителей использовать химически чистый метиловый спирт и глицерин, так как примеси ухудшают свойства красителя. Вместо метилового спирта можно применять 100 % этиловый спирт. Приготовленную красящую смесь хранят в сухом прохладном месте в плотно закрытом сосуде.

#### **Специальный стандартный раствор Гимза:**

Состав красителя:

Азур 1 – 3,772 г

Эозин – 2,165 г

Метиленовая синька (медиц.) – 1,563 г

Метанол (ЧДА) – 750,0 мл

Глицерин (ЧДА) – 256,0 мл

#### **Методика окраски**

Мазки, фиксированные в метиловом спирте, окрашивают раствором (1 мл готовой жидкой краски + 2 мл основного буферного раствора + 47 мл дистиллированной воды) в течение 40–120 мин (продолжительность окрашивания подбирают эмпирически). Пользуются фосфатным буфером, но рН буфера зависит от

вида мазка: для мазка костного мозга – 5,8 – 6,0, для мазка крови – 6,4 – 6,5, для выявления простейших – 6,8, малярийного плазмодия – 7,0 – 7,2.

Ополаскивают в дистиллированной воде, высушивают и исследуют при иммерсии.

**Окрашивание по Папаниколау.** Американский анатом, гистолог и цитолог Джордж Н. Папаниколау (1883-1962) в 1943 г. опубликовал книгу «Диагностика рака матки путем изучения влагалищных мазков» (Diagnosis of uterine cancer by vaginal smear), в которой предложил простую и эффективную диагностику этого злокачественного новообразования. Он предложил к окрашиванию двумя классическими красителями, эозином и гематоксилином, добавить еще третий краситель – оранжевый II или G. Таким образом, в окрашенном мазке цервикального эпителия будут четко различаться клетки трех цветов – красные, голубые и оранжевые; по их соотношению можно диагностировать рак шейки матки. Данный метод, ПАП-мазок (PAP Smear Test), названный именем Папаниколау, получил широкое распространение в развитых странах.

Несмотря на все технологические новшества, которые появились в цитологической диагностике за последние годы, метод окраски мазков по Папаниколау остается одним из немногих быстрых средств ранней диагностики рака шейки матки.

**Фиксация мазков.** Для исключения артефактов окрашивания мазки после приготовления необходимо стабилизировать. Некачественно подготовленный (нестабилизированный) клеточный материал также некачественно и окрашивается, что в итоге может привести к неадекватным результатам диагностики. Надежная фиксация препарата является важнейшей отправной точкой всего исследования. Cervix spray fixative – уникальный нетоксичный реагент (в состав входят специальные гликоли в спиртовом растворе), предназначенный для предварительной фиксации клеточных препаратов при окрашивании по методу Папаниколау. Процедура фиксации заключается в распылении раствора (с расстояния 10...15 см, при помощи пульверизатора – как показано на фото) на предметное стекло со стандартно подготовленным к окрашиванию препаратом. Для удобства распыления вместе с каждым флаконом раствора поставляется пульверизирующая насадка.

**Красители.** Назначение реагентов: гематоксилин окрашивает ядра в голубой цвет, оранжевый краситель (OG 6 или O II) дополнительно контрастно окрашивает цитоплазму, модифицированный эозин (EA50) специфически окрашивает цитоплазму (парабазальные клетки – насыщенный сине-зеленый цвет, средние клетки – бледный зелено-синий цвет, зрелые поверхностные клетки – розовый цвет), кератин (красный цвет), эритроциты (ярко красный цвет). Оптимизированный состав EA50 позволяет хорошо окрасить эритроци-

ты, нуклеоли и гранулы эозинофилов. При окрашивании гематоксилином хорошо отображается структура хроматина.

**Скотч-раствор.** Использование гематоксилина совместно со Scotch solution гарантирует устойчивую цветопередачу и обеспечивает яркость и отчетливость голубой окраски ядер в препаратах.

Все реагенты производства J.T.Baker готовы к применению и не требуют разведения. Красители Папаниколау, гематоксин и эозин являются продуктами, выпускаемыми по современной технологии с полным контролем временных и температурных процессов производства. Постоянное перемешивание красителя при производстве предотвращает выпадение осадка (кристаллов) при его хранении, гарантирует высокую стабильность продукта и в итоге – устойчивость, яркость и контрастность окрашенных препаратов.

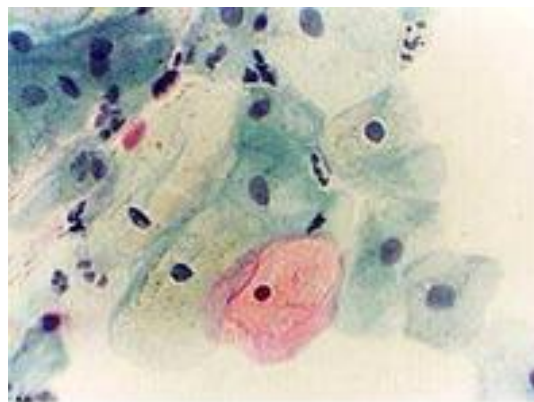
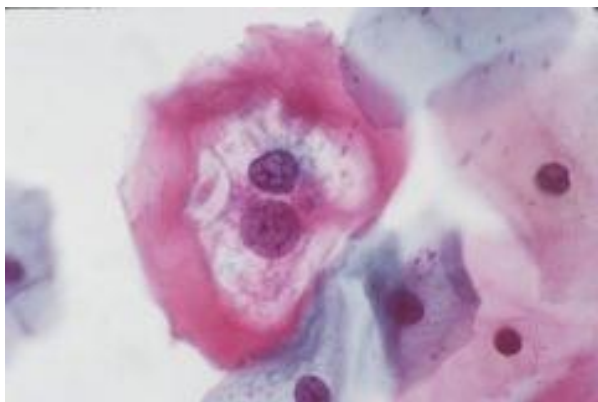
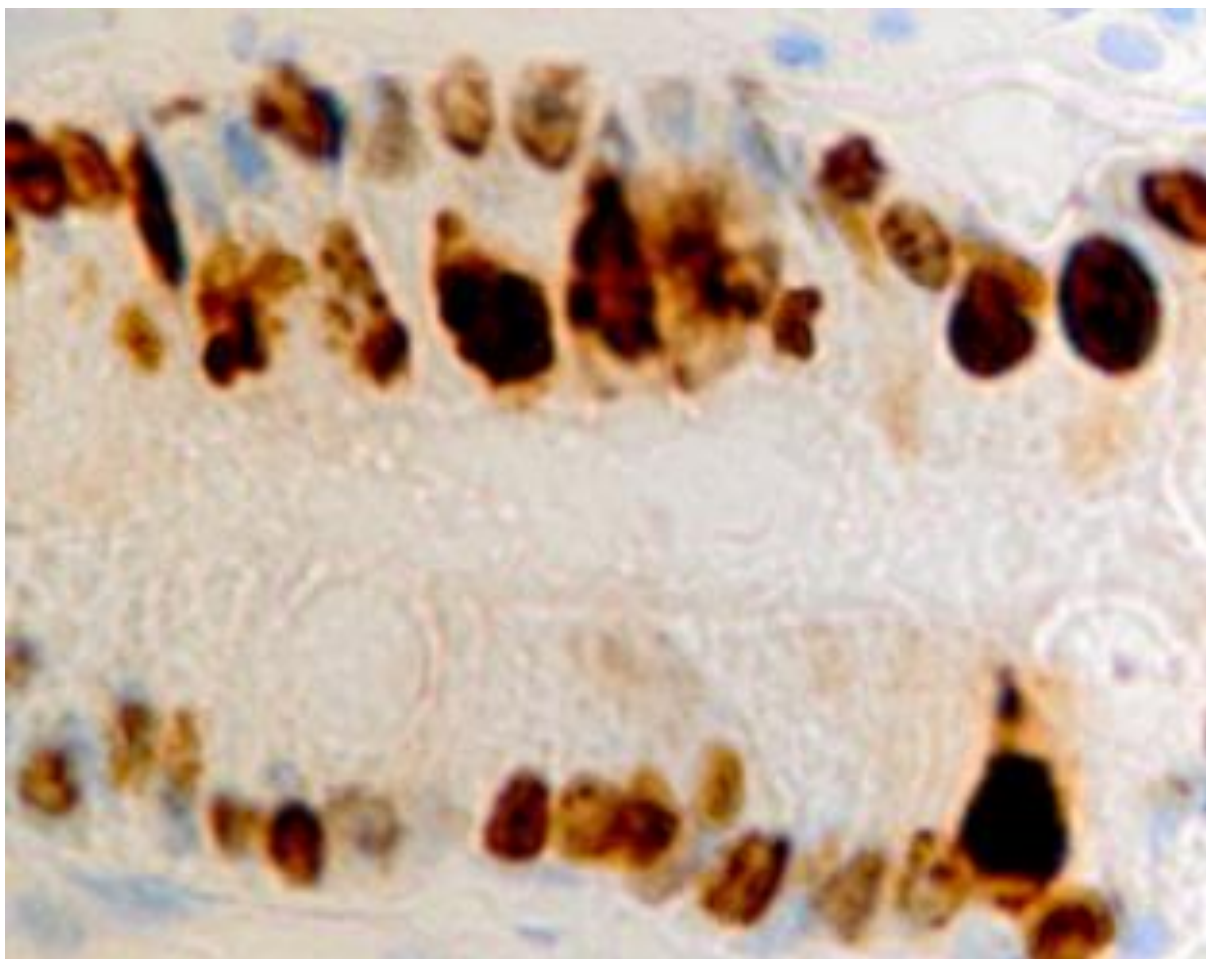


Рис. 16. Мазок, окрашенный по Папаниколау.

**Метод иммунной гистохимии.** Одним из основных методов морфологического исследования является иммуногистохимическое фенотипирование на основе кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD). Иммуногистохимически можно выявлять микроорганизмы, клетки тканей, активность гена Ki67, CD4, CD8, CD68, CD163 и т.д. (всего создано более 2000 маркеров) маркёрами фирмы DAKO для иллюстрации и последующего сравнительного анализа их количества в разные возрастные периоды и в динамике заболевания. Интенсивность пролиферативных процессов в эпителиальной пластинке оценивается по митотическому индексу посредством маркера Ki-67 в расчёте количества митозов на 100 клеток. С помощью моноклональных антител (клон KP1, код №М 0814, лот 119) выявляют макрофаги по маркёру CD68 (высокогликозилированный трансмембранный гликопротеин, который локализуется в лизосомах). Демаскировка антигенных детерминант проводится в стеклянном контейнере, заполненном восстанавливающим раствором, с созданием водяной бани в течение одного часа. Препараты обрабатывают в течение 30 минут с помощью микроволнового излучения, которое даёт лучший демаскировочный

эффект. Для демаскировки антигенов используют 10 ммоль/л цитратный буфер с pH 6,0 или DAKO TRS (Target retrieval solution, code № S1700). Остывшие препараты промывают в дистиллированной воде. Антитела применяют чаще в разведении 1:50 и 1:100. Современные высокочувствительные иммуногистохимические методы проводятся с использованием автоматизированных систем EPOS и En Vision. Идентификация иммунокомпетентных клеток проводится по одинаковой схеме, несмотря на различную локализацию антигена в клеточных структурах: мембраны, лизосомы, ядра, комплекс Гольджи.



*Рис. 17.* Выявление белка гена Ki67 в эпителии желудка человека. Иммуногистохимия. Отражает клеточную пролиферативную активность. (Фото Рева Г.В., Рева И.В.)



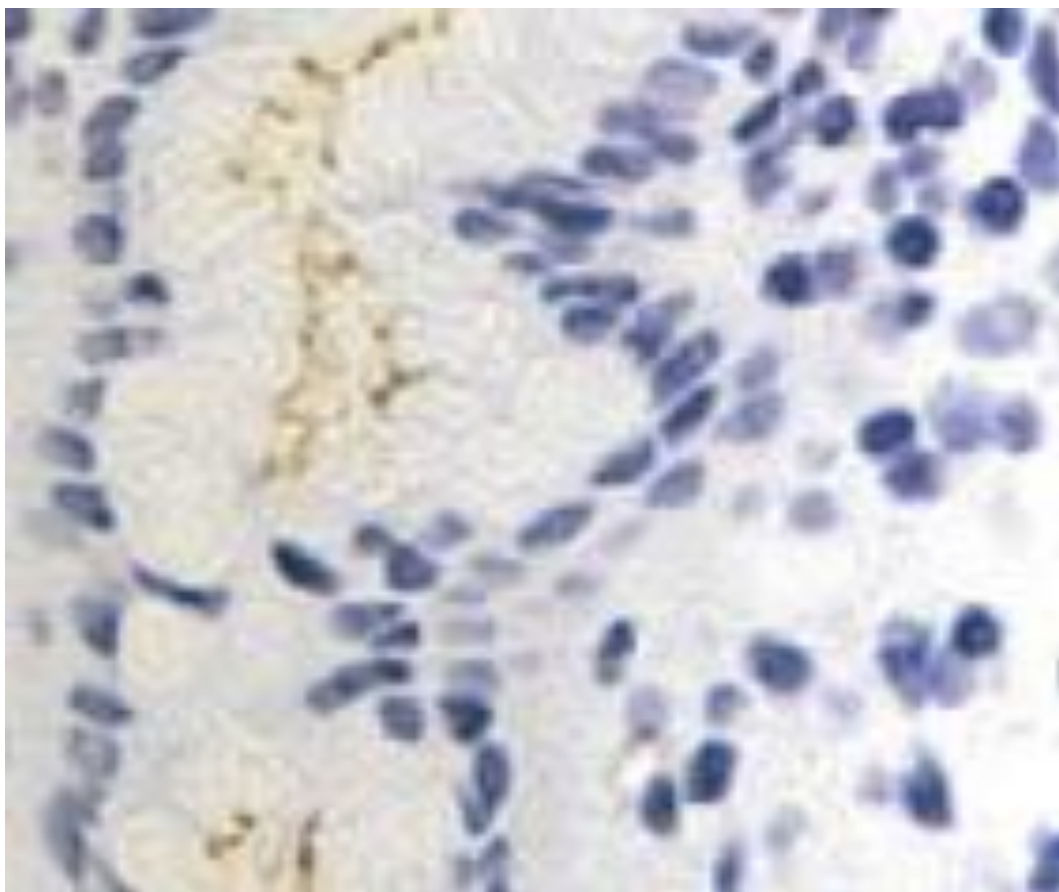


Рис. 18. Коричневая метка *Helicobacter Pylori* в просвете желёз желудка.  
(Фото Рева Г.В., Рева И.В.)

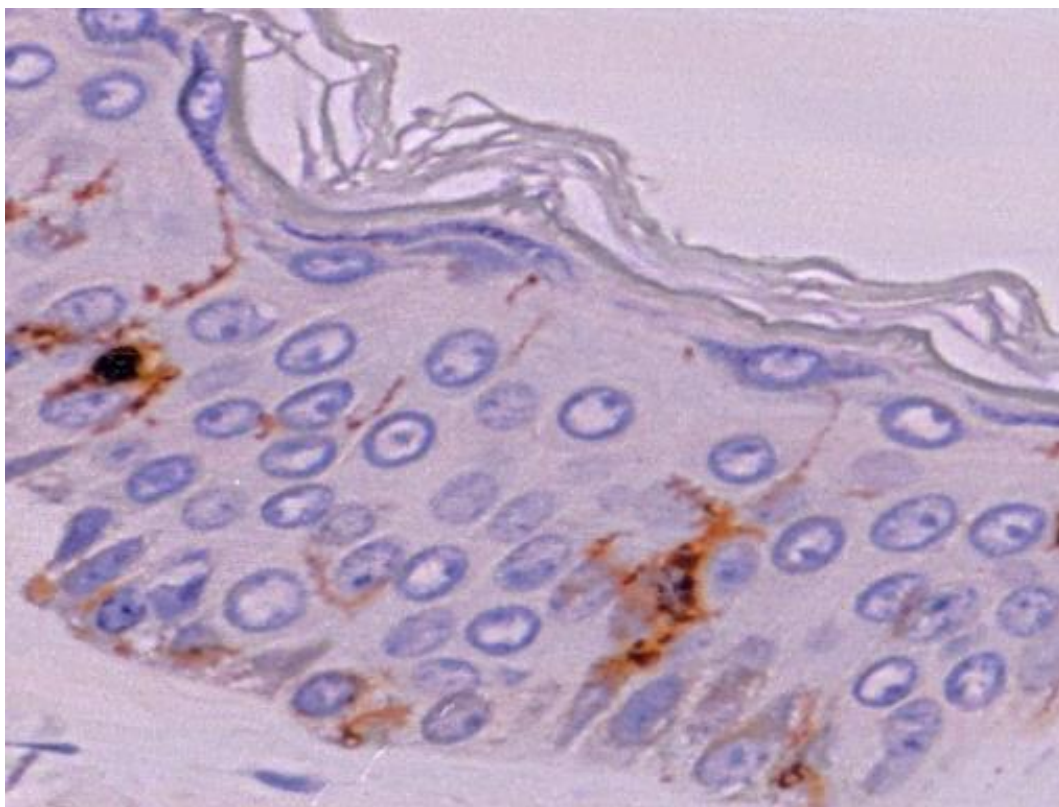
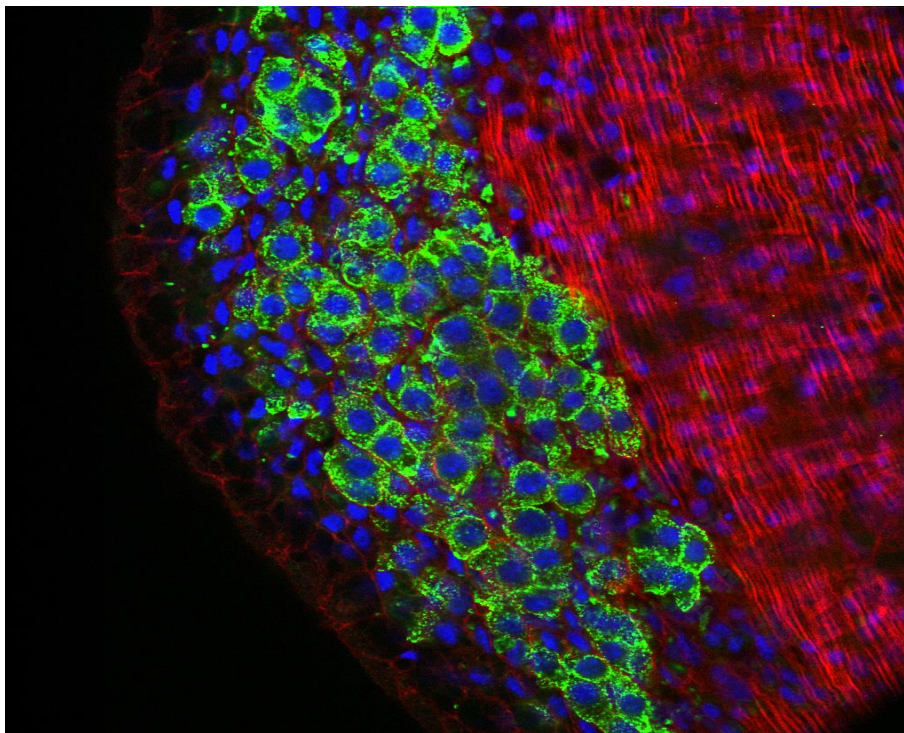


Рис. 19. Клетки Лангерганса в эпителии кожи человека.  
(Фото Рева Г.В., Рева И.В.)



*Рис. 20.* Опухолевая ткань в организме гидры. Синим окрашены ядра раковых стволовых клеток, зеленым – маркеры стволовых клеток, красным – цитоскелет клеток. (Фото: Anton-Erxleben) фото по ссылке <http://www.lifesciencetoday.ru/index.php/rak/1118-cancer-the-roots-of-evil-go-deep-in-time>

### **Ситуационные задачи.**

1. Исследователю необходимо выявить жировые включения в клетке. Какими методами окраски можно воспользоваться для достижения поставленной цели?
2. Какими методами окраски можно пользоваться для выявления эластических структур?
3. Какими методами окраски можно пользоваться для выявления гликогена?
4. Какой метод исследования можно применять для выяснения источников и путей иннервации органов?
5. Каким методом микрокопирования необходимо воспользоваться для определения сухого веса клетки?

### **Техническое обеспечение учебного процесса**

1. Тестовый контроль с использованием пакета компьютерных программ;
2. Обеспечение иллюстративной части занятия наглядными пособиями (стенды, таблицы, электроннограммы) с использованием мультимедиа (Multimedia Projector DV – thenter);
3. Микроскопы.
4. Наборы учебных и демонстрационных препаратов.

**Домашнее задание** – см. учебно-методическую разработку лабораторных занятий для студентов по теме: **«Формы организации живой материи. Цитоплазма и ядро клетки».**



### ТЕМА 3. ФОРМЫ ОРГАНИЗАЦИИ ЖИВОЙ МАТЕРИИ. ЦИТОПЛАЗМА И ЯДРО КЛЕТКИ

#### Краткое содержание темы

Живую материю называют «**протоплазмой**». Этот термин был впервые предложен Яном Пуркинье в 1840 году. Принято различать первичные и вторичные формы организации протоплазмы. Вторичные формы – это весь многоклеточный мир. Первичной формой протоплазмы является **эукариотическая клетка** многоклеточных. Это главная, исторически сложившаяся форма организации живой материи, обладающая всеми свойствами жизни, имеющая ядро, цитоплазму и цитоплазматические органеллы.

Для выполнения некоторых специальных жизненно необходимых функций, клетки объединяются в надклеточные образования, которые рассматривают как адаптивные формы протоплазмы – симпласт, синцитий, межклеточное вещество.

**Симпласт** представляет собой нерасчлененную на клетки протоплазму с большим количеством ядер. Типичным примером симпласта является скелетная и мимическая поперечно-полосатая мышечная ткань, составляющая от массы организма 50-60%, которая образуется в результате слияния множества клеток-миобластов, или путем абортного деления.

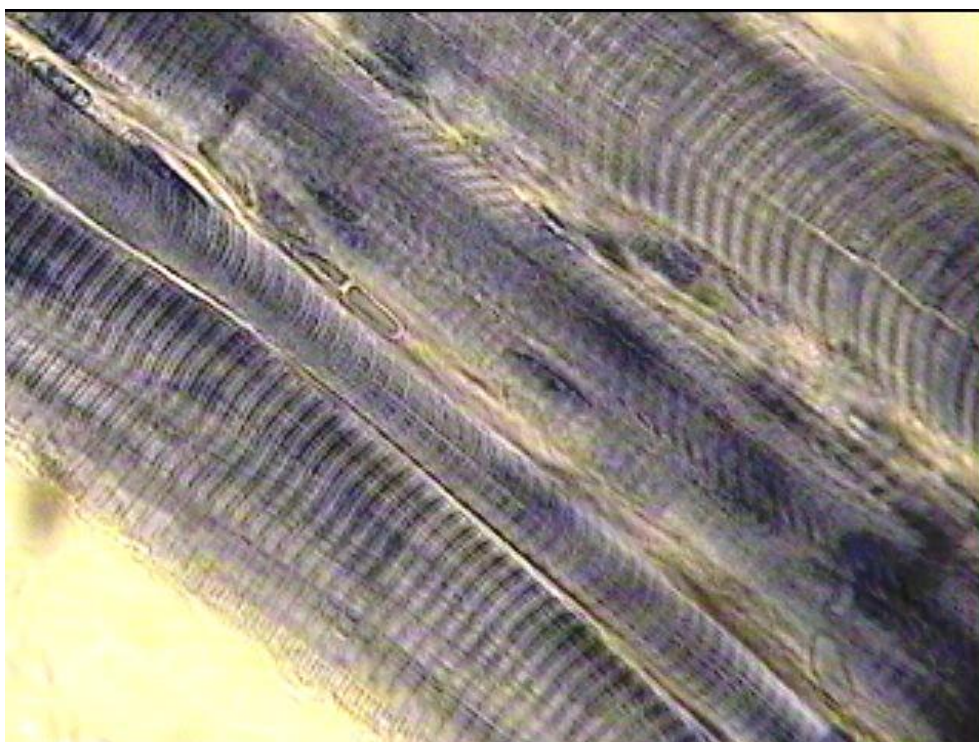


Рис. 21. Поперечно-полосатая мышечная ткань языка.  
Окраска железным гематоксилином. Микрофото. Ув. х 400.  
(Фото Рева Г.В., Рева И.В.)

**Синцитий** или соклетие – первичная надклеточная форма организации жизни, представленная протоплазматической решеткой, в узлах которой лежат ядра. У человека синцитиально связанные между собой клетки сохранились в семеннике, где эти связи синхронизируют процессы сперматогенеза.

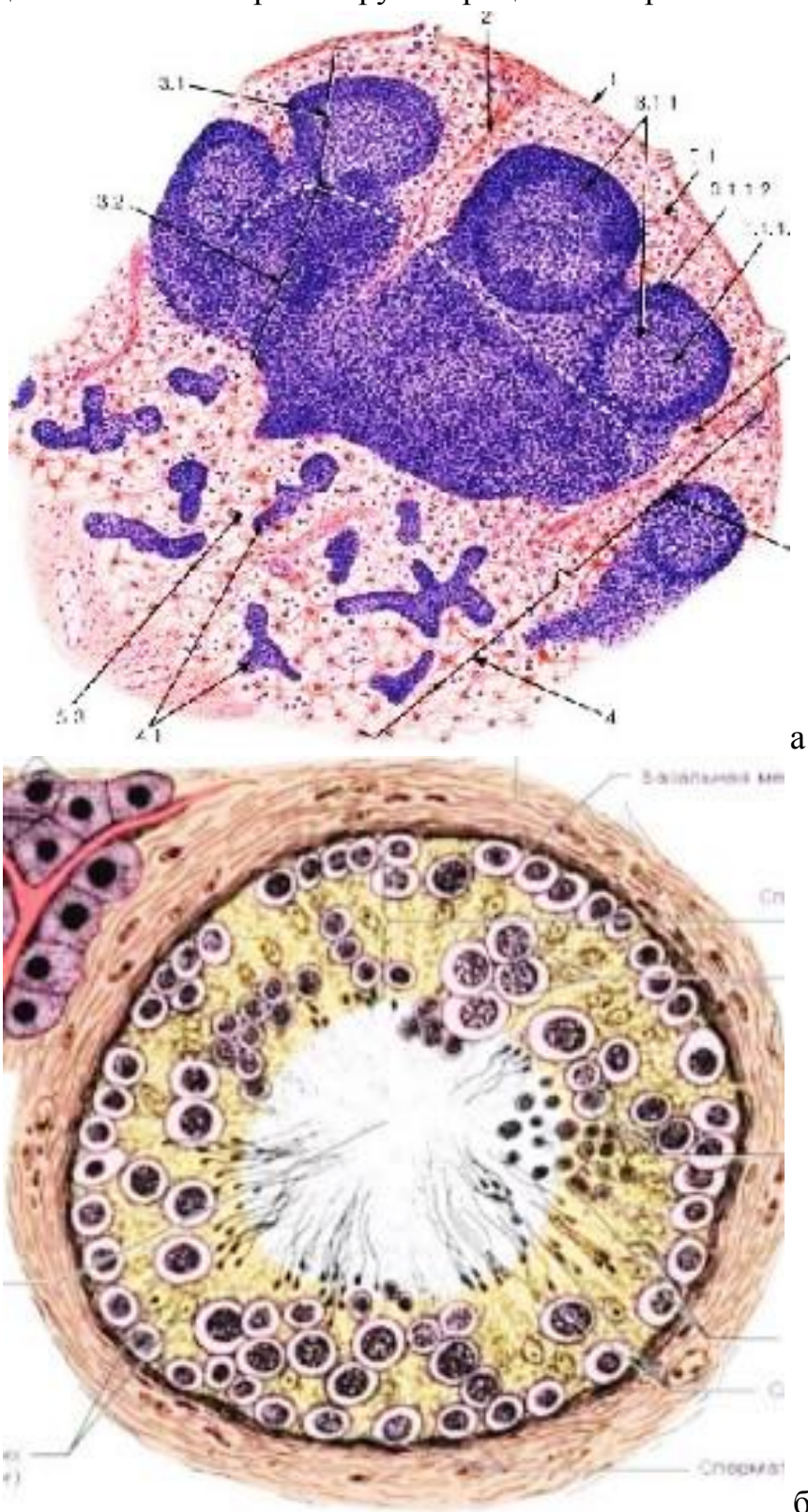


Рис. 22. Ретикулярная ткань лимфоузла (а) и сперматогенный эпителий (б).



**Межклеточное вещество** – «цемент» или «параплазма». Это продукт синтетической деятельности клеток. В межклеточном веществе различают два главных компонента: основное вещество (гликозаминопротеогликаны и гликопротеины) и погруженные в него волокна (коллагеновые, эластические, ретикулярные). Межклеточное вещество ярко выражено в тканях, выполняющих опорно-механические функции (костная, хрящевая, плотные соединительные ткани).

Клетка – главная элементарная форма организации живой материи, предел делимости, в которой жизнь проявляется во всей своей полноте.

В организме человека количество клеток варьирует от 10% до 40% в зависимости от возраста. Клетки различаются по величине, форме и продолжительности жизни.

**Величина клетки** определяется ядерно-цитоплазматическими отношениями и отношением площади поверхности к объему цитоплазмы, которые должны быть постоянными. Смещение константы ведет либо к делению клетки, либо к ее гибели.

**Форма клетки** (призматическая, веретеновидная, шаровидная, звездчатая) тесно связана с ее функцией. Между формой и содержанием, структурой и функцией имеется диалектическое взаимодействие.

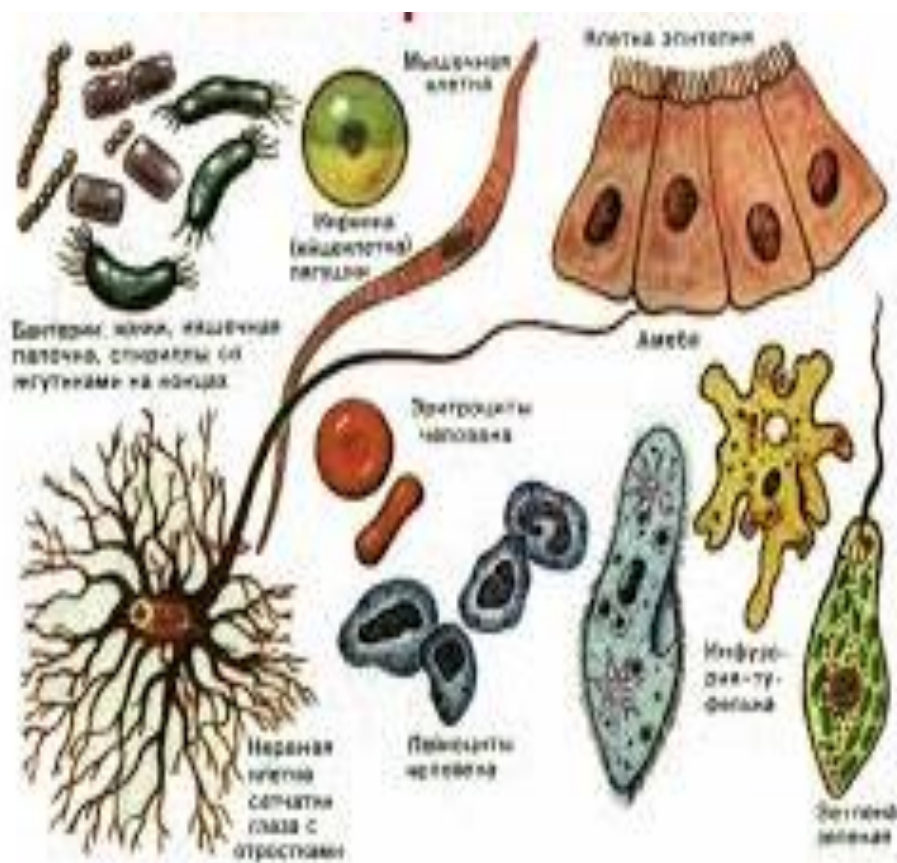


Рис. 23. Разнообразие форм клеток

Основными структурными компонентами клетки являются: 1. клеточная поверхность (надмембранный комплекс, плазматическая мембрана, подмембранный комплекс); 2. (2-8, 11, 12) цитоплазма (гиалоплазма, органеллы и включения); 3. (9-10) ядро (кариолемма, ядрышко, хроматин, кариолимфа).

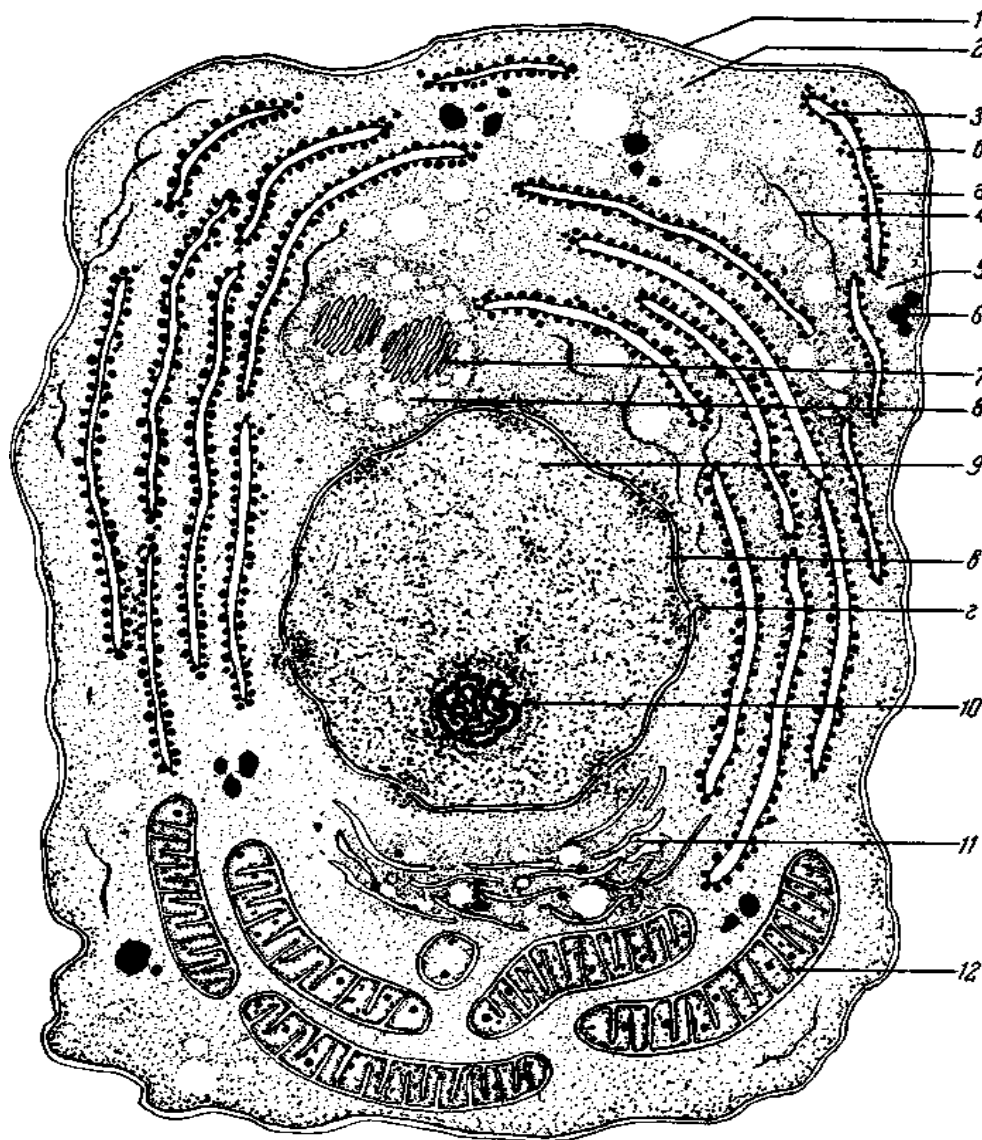


Рис. 24. Ультраструктура клетки.

Клеточная поверхность выполняет следующие функции: разграничительная, барьерно-защитная, рецепторная, транспортная, контактная, опорно-механическая, двигательная. Ее основными химическими компонентами являются: липиды (40%), белки (50%) и углеводы (10%). Соотношение этих веществ может варьировать в зависимости от функциональной активности клетки. Основой клеточной поверхности является плазматическая мембрана (цитолемма), которая представлена билипидным слоем со встроенными в него интегральными, полуинтегральными и периферическими белками. Над цитолеммой располагается гликокаликс, образованный гликолипидами и гликопротеидами; под

мембранной находится субмембранный комплекс, состоящий из микротрубочек и микрофиламентов цитоскелета.

Гиалоплазма – внутренняя среда клетки, на которую приходится до 55% ее общего объема. По физико-химическим свойствам – это сложная коллоидная система, переходящая из состояния геля в золь. Она содержит много воды – свободной, метаболической и связанной, 20-30% глобулярных белков, аминокислоты, жирные кислоты, моносахара, полипептиды, т-РНК, микроэлементы. В гиалоплазму погружены цитоплазматические органеллы и ядро.

Ядра различаются по форме, расположению и величине. Форма ядра чаще всего соответствует форме клетки: сферическое ядро чаще всего в клетках округлой или кубической формы, эллипсоидное – в высоких призматических клетках, уплощенное – в плоских. В высокоспециализированных клетках крови (эозинофилы, нейтрофилы) встречаются сегментированные ядра. Ядро состоит из кариолеммы, кариоплазмы, ядрышка и хроматина. Кариолемма – двумембранная ядерная оболочка, представленная наружной и внутренней мембранами, между которыми располагается перинуклеарное пространство. Ядерные поры занимают 3-35% поверхности ядра. Пора содержит два параллельных кольца, в каждом из которых по периферии располагаются 8 белковых гранул; от них к центру сходятся фибриллы, формирующие перегородку – диафрагму; в центре лежит центральная гранула. Кариоплазма – ядерный сок, в котором располагаются хроматин и ядрышко. Это коллоидный раствор сложных белков (гистонов, ферментов, структурных белков), углеводов, нуклеотидов, а также различных ионов и метаболитов. Хроматин состоит из комплекса ДНК и белка. В зависимости от степени спирализации отдельных участков хромосом выделяют два вида хроматина: 1.эухроматин – слабо окрашен, соответствует деспирализованным участкам хромосом, которые открыты для транскрипции; 2.гетерохроматин – соответствует конденсированным участкам хромосом, интенсивно окрашивается основными красителями, имеет вид глыбок и располагается в основном под кариолеммой и вокруг ядрышка. Ядрышко – плотный структурный компонент ядра, образованный специализированными участками хромосом, которые называются ядрышковыми организаторами. На ультраструктурном уровне в ядрышке выделяют три компонента: фибриллярный, гранулярный и аморфный.



Время лабораторного занятия: 3 часа

**Хронокарта:**

1	Организационная часть с мотивацией темы	5 мин
2	Программированный контроль	10 мин
3	Опрос-беседа	35 мин
4	Объяснение препаратов	10 мин
5	Перерыв	15 мин
6	Контроль за самостоятельной работой студентов. Помощь в работе с препаратами	65 мин
7	Подведение итогов. Проверка альбомов	10 мин

Мотивационная характеристика темы: Изучение основных форм организации живой материи необходимо для освоения как общей, так и частной гистологии. Знание сущности процессов протекающих в клеточных мембранах, органеллах, ядре, а так же реакцию клетки на повреждение, признаки паранекроза, некроза и апоптоза клетки, способы и уровни адаптации клетки к условиям внешней среды открывает для будущих врачей путь к более детальному пониманию вопросов патологии и, следовательно, более успешному лечению различных заболеваний. Необходимо отметить значение изучаемой темы для ранней диагностики, успешного лечения, укрепления здоровья людей, предупреждения появления потомства с наследственными заболеваниями. Подчеркнуть, что воздействие неблагоприятных факторов внешней среды, вредных привычек (курение, алкоголь) способствует нарушению клеточного цикла, приводит к порокам развития и опухолевому росту.

**Учебная цель**

Общая цель – Изучить основные формы организации живой материи. Разобрать строение цитоплазмы и ядра клетки, их химический состав и значение.

Конкретная цель – 1.Знать адаптивные формы организации живой материи, производные клетки: симпласт, синцитий, межклеточное вещество и его значение. 2.Клетка как главная форма организации протоплазмы. 3.Величина и форма клеток, факторы их обуславливающие. 4.Классификация органелл. 5.Клеточная поверхность и ее функции.

**Необходимый исходный уровень знаний**

Из других предметов и предшествующих тем:

1.Общая морфология клетки.

**Из темы текущего занятия:**

1.Основные формы организации живой материи.

2.Определение клетки.

3. Величина и форма клетки и факторы их обуславливающие.
4. Химический состав гиалоплазмы.
5. Клеточная поверхность, ее роль и значение.
6. Химический состав и структура ядра, его значение.

#### **Вопросы для самоподготовки**

1. Клетка как главная форма организации живой материи. Факторы определяющие величину и форму клеток.
2. Симпласт и синцитий как адаптивные формы протоплазмы.
3. Межклеточное вещество и его значение.
4. Клеточная поверхность, ее структура, значение и функции.
5. Химический состав гиалоплазмы.
6. Химический состав и структура ядра, форма и размеры ядра.
7. Особенности строения ядерной оболочки.
8. Ядрышко и его значение.

#### **Рекомендации для работы на занятии**

##### **Задание 1. Изучить строение призматических клеток.**

**Объект изучения** – Высокий призматический эпителий извитых канальцев почки (окр. гематоксилин-эозин).

**Программа действий** – На малом увеличении найти, на большом увеличении зарисовать клетки цилиндрической формы (1), цитоплазму (2), ядро (3).

**Ориентировочные основы действий** – На препарате найти просвет канальца почки, ограниченный розовой полоской из клеток, лежащих в один ряд и имеющих цилиндрическую или кубическую форму (1). Цитоплазма розовая (2), ядра клеток темно-фиолетовые (3) лежат ближе к базальной части клеток.

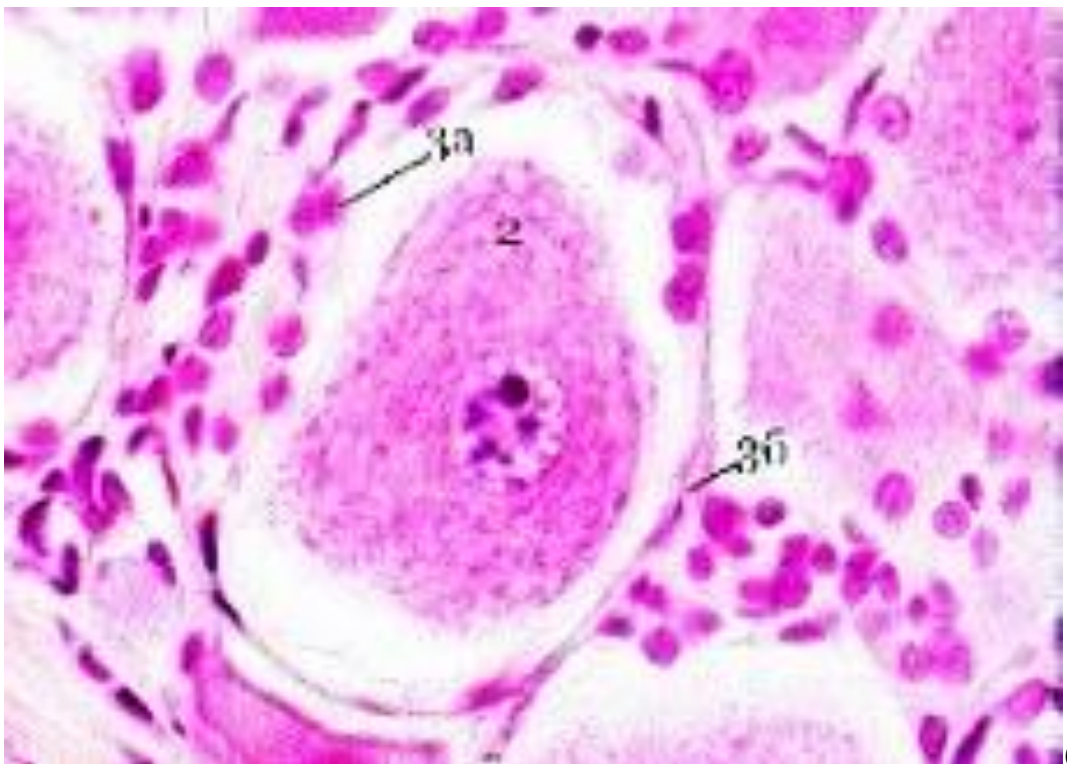
##### **Задание 2. Рассмотреть клетки шаровидной формы.**

**Объект изучения** – Спинномозговой узел (окр. гем.-эозином).

**Программа действий** – На малом увеличении найти, зарисовать на большом увеличении клетки шаровидной формы (1), цитоплазму (2), ядро клетки (3).



а



б

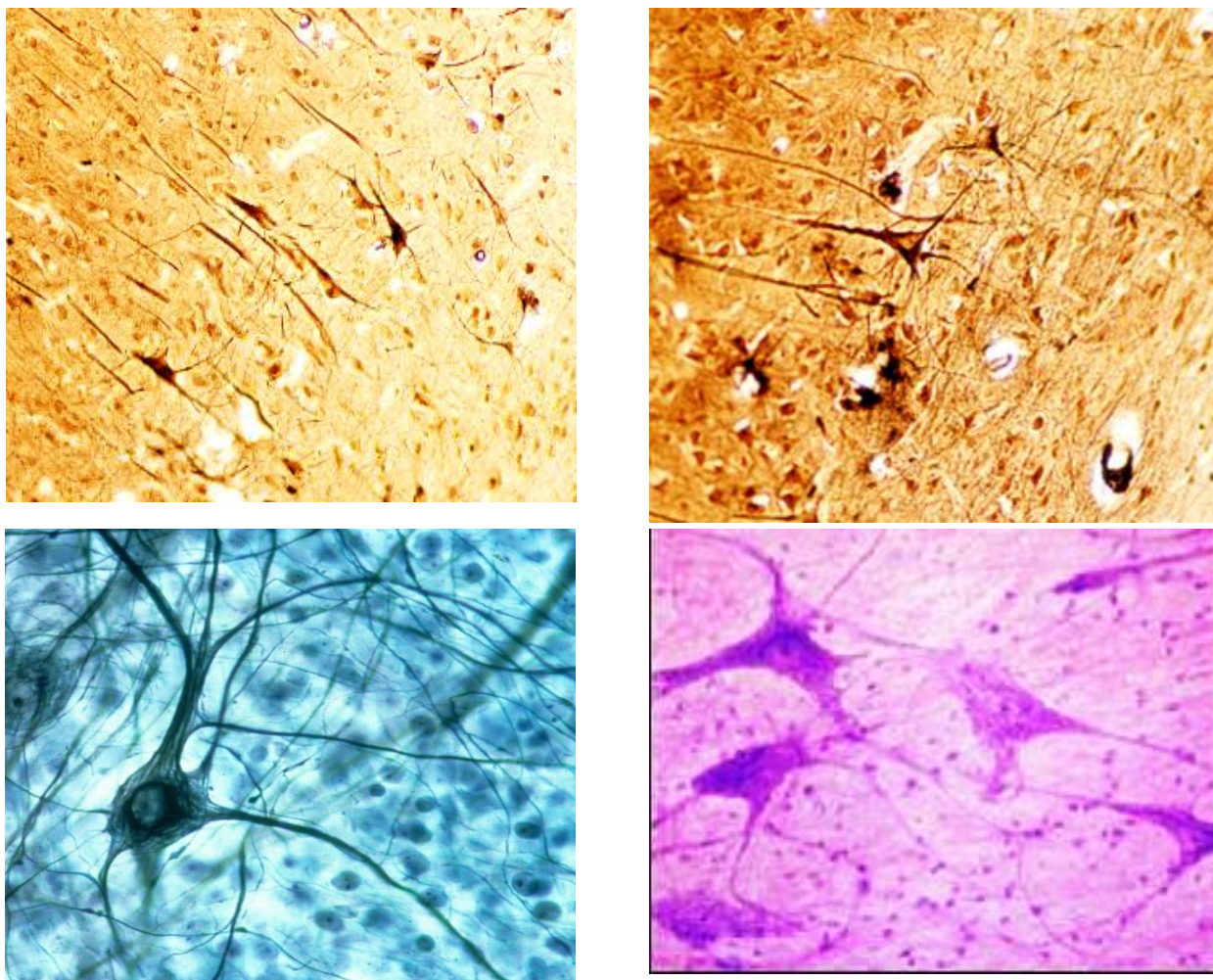
Рис. 25. Клетки шаровидной формы в спинномозговом узле. Окраска г/э.

**Ориентировочные основы действий** – На препарате по периферии тела спинномозгового узла найти клетки округлой формы (1) со светло-сиреневой цитоплазмой (2) и ядром фиолетового цвета (3), расположенным в центре клетки, в ядре отметить ядрышко (4).



### **Задание 3. Изучить строение клеток звездчатой формы.**

*Объект изучения* – Спинной мозг (окр. импрегнация серебром по Кахалю).



*Рис. 26. Нервная ткань*

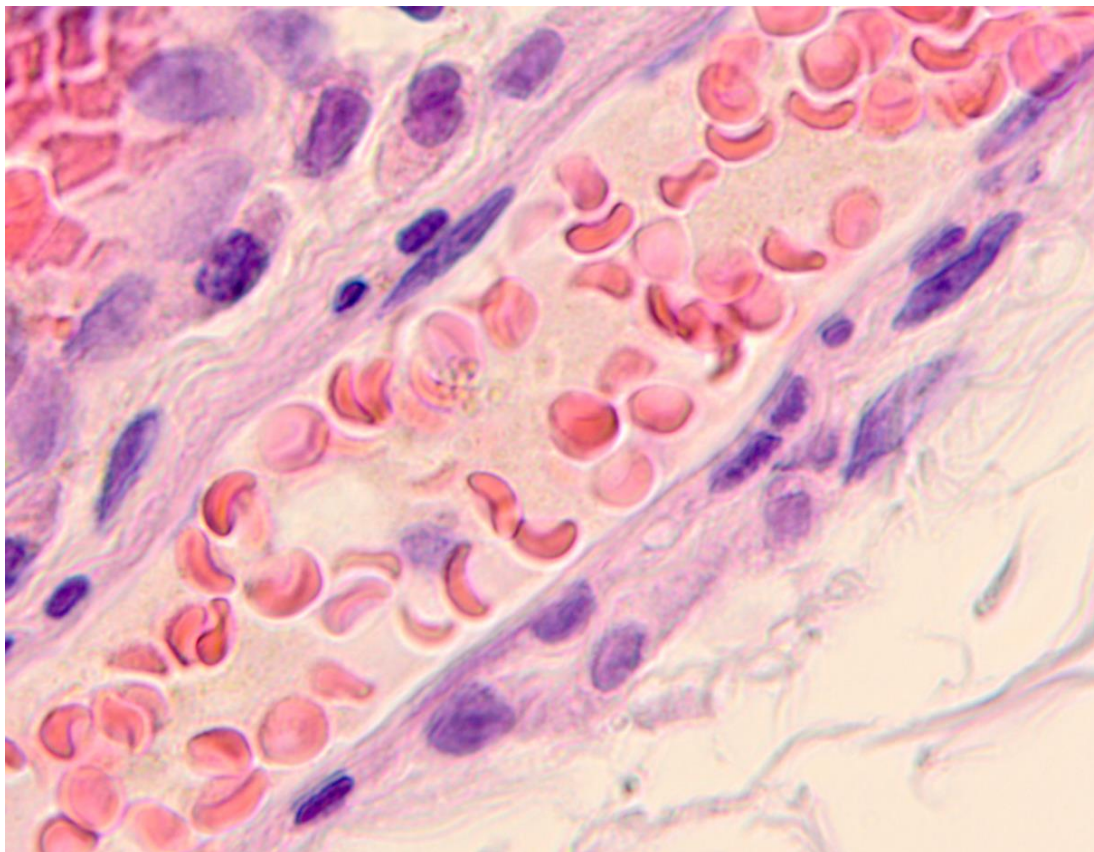
**Программа действий** – На малом увеличении найти и рассмотреть, на большом увеличении зарисовать клетки звездчатой формы (1), отростки клеток (2), цитоплазму (3) и ядро (4).

**Оrientировочные основы действий** – На препарате увидеть по периферии более светлое – белое вещество, а ближе к центру в виде бабочки более темное – серое вещество спинного мозга. В сером веществе найти скопления темнокоричневых клеток отросчатой формы (1).

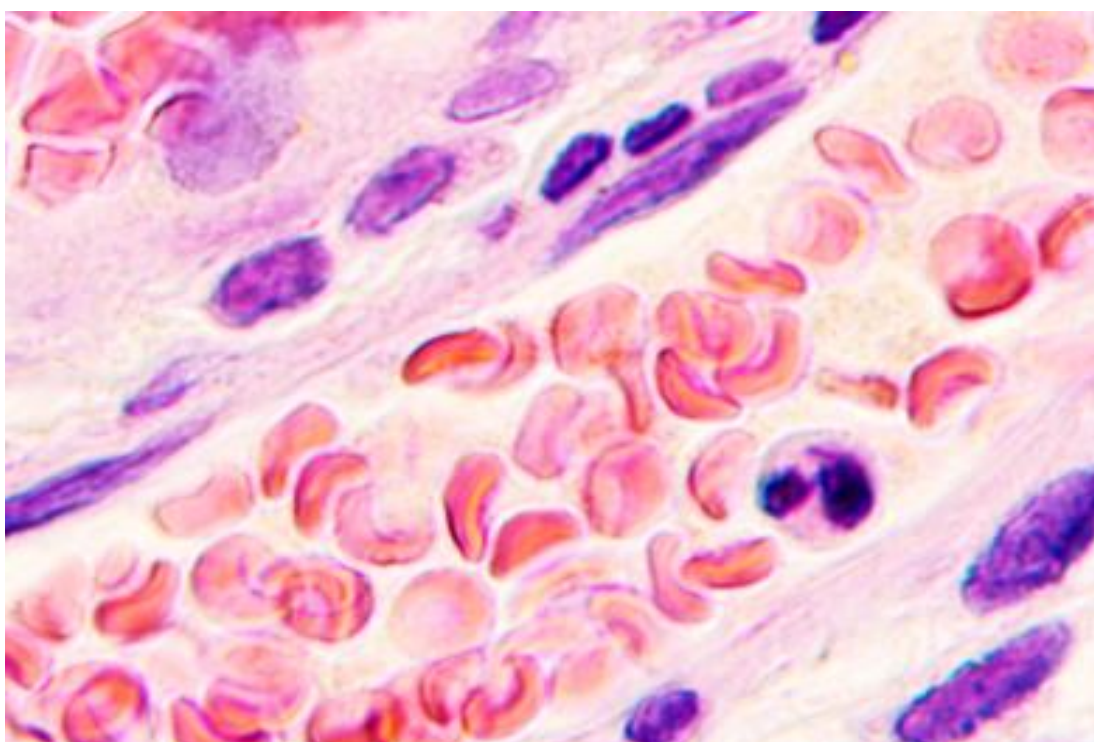
### **Задание 4. Рассмотреть строение клеток с различной формой ядра.**

*Объект изучения* – Препарат мазок крови (окр. гем.-эозином)

**Программа действий** – На большом увеличении найти клетки с округлой формой ядра (1), клетки с сегментированной формой ядра (2), клетки с бобовидной формой ядра (3).



*Рис. 27. Клетки с круглыми и веретеновидными ядрами*



*Рис. 28. Клетка крови в просвете сосуда с сегментированным ядром  
(Фото Рева Г.В., Рева И.В.)*



**Ориентировочные основы действий** – Среди форменных элементов крови найти клетки с розовой цитоплазмой и фиолетовыми ядрами округлой (1), бобовидной (3) и дольчатой формы (2).

**Задание 5. Изучить строение симпласта.**

**Объект изучения** – Препарат поперечнополосатой мышечной ткани (окр. железный гематоксилин).

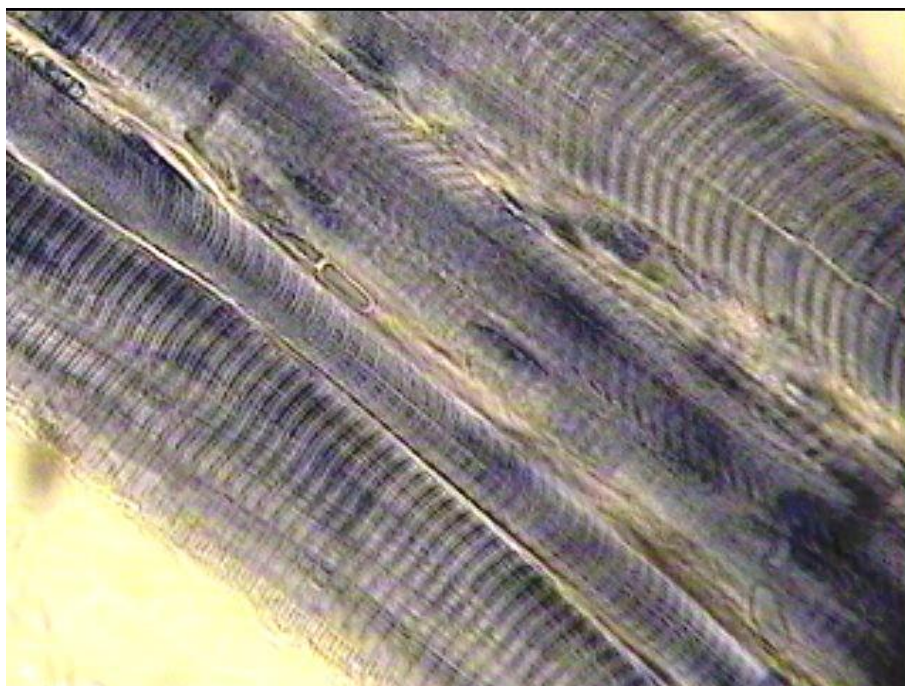


Рис. 29. Симпласты. Поперечнополосатая мышечная ткань языка человека.  
Окраска ж/г.

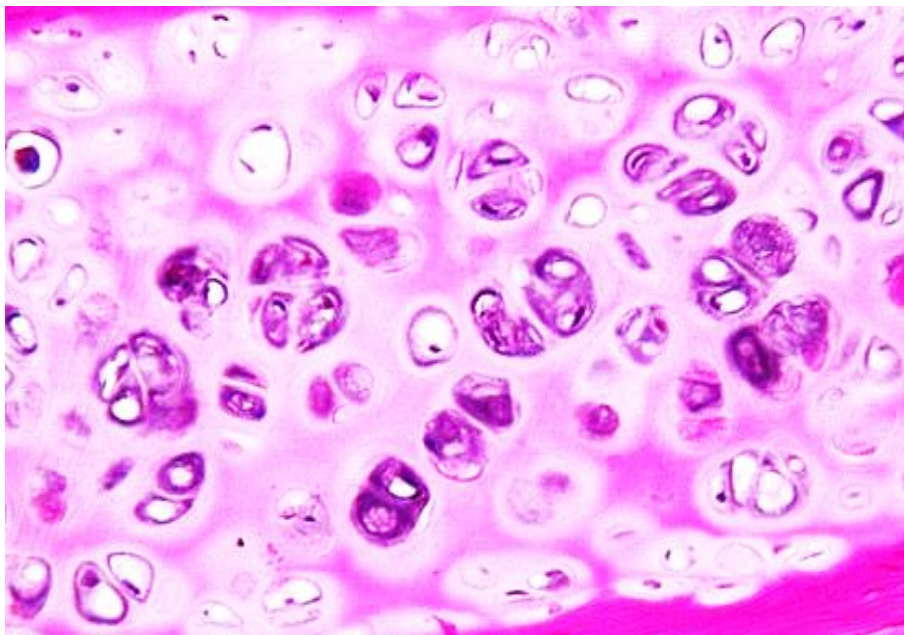
**Программа действий** – На малом увеличении найти и рассмотреть, на большом увеличении зарисовать и обозначить мышечные волокна (1), саркоплазму (2), сарколемму (3), ядра (4).

**Ориентировочные основы действий** – На препарате найти группу мышечных волокон синего цвета с продольной ориентацией (1). Ядра удлинённой формы (4) располагаются по периферии волокна ближе к сарколемме (3). В саркоплазме (2) видна поперечная исчерченность (5).

**Задание 6. Рассмотреть межклеточное вещество.**

**Объект изучения** – Препарат гиалинового хряща (окр. гематокс.-эозином).

**Программа действий** – На малом увеличении найти и рассмотреть, на большом зарисовать и обозначить хрящевые клетки (1), межклеточное вещество (2).



*Рис. 30.* Межклеточное вещество гиалинового хряща Ориентировочные основы действий – На препарате найти светлые клетки, расположенные группами (1) и межклеточное вещество (2) розового цвета.

**Задание 7. Зарисовать схемы электронномикроскопического строения ядра и клеточной поверхности.**

#### **Ситуационные задачи**

1. Известно, что некоторые клетки обладают высокой подвижностью. Какие образования клеточной поверхности обеспечивают этот процесс?

2. Клетку обработали препаратом, блокирующим функцию ядрышка. Как это отразится на жизнедеятельности клетки?

3. На препарате видна гистологическая структура, ограниченная плазматической мембраной, под которой располагается большое количество уплотненных ядер, ближе к центру обнаруживается поперечная исчерченность. Как называется эта структура?

#### **Техническое обеспечение учебного процесса.**

1. Тестовый контроль с использованием пакета компьютерных программ;  
2. Обеспечение иллюстративной части занятия наглядными пособиями (стенды, таблицы, электроннограммы) с использованием мультимедиа (Multimedia Projector DV – thenter);  
3. Микроскопы;  
4. Наборы учебных и демонстрационных препаратов.

**Домашнее задание** – см. учебно-методическую разработку лабораторного занятия по теме: «Морфология обмена веществ в клетке».



## **ТЕМА 4. МОРФОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКЕ**

### **Краткое содержание темы**

Морфология обмена веществ в клетке – это постоянно меняющееся взаимодействие биологических мембран, организованное в пространстве и во времени (ГЭРЛ-система и поток мембран в клетке). ГЭРЛ-система включает в себя комплекс Гольджи (К. Гольджи, 1898), эндоплазматический ретикулум (К. Портер, 1945) и лизосомы (Де Дюв, 1955).

Метаболизм обеспечивается тремя основными функциями клетки:

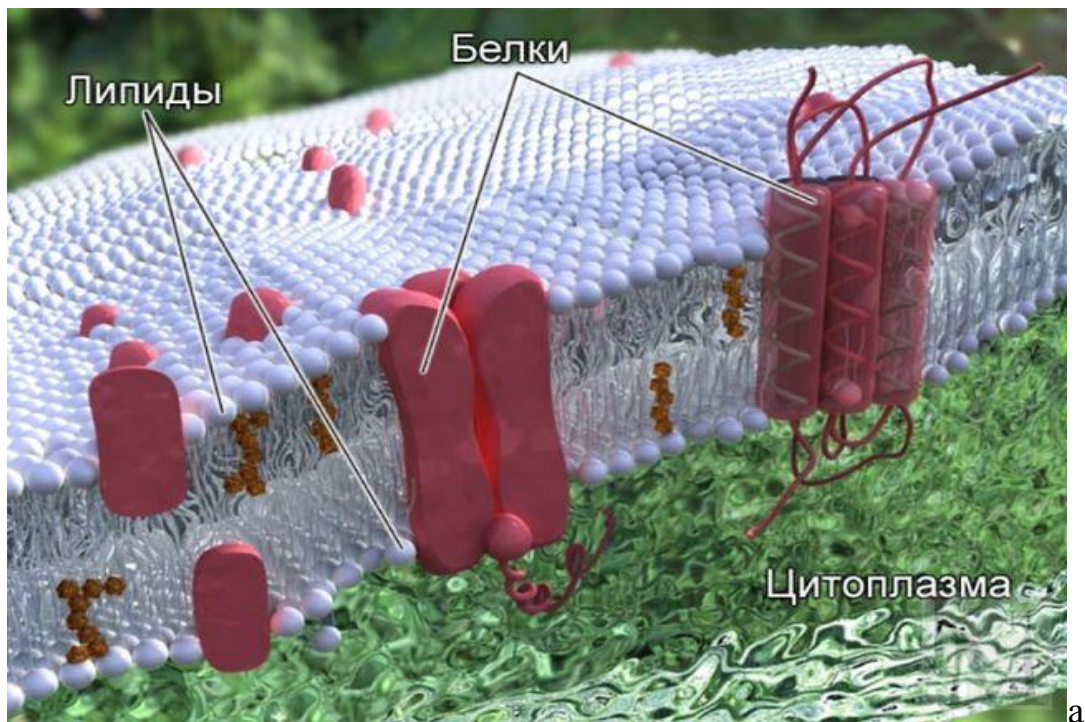
**1. Синтетическая функция** – с одной стороны эндоплазматический ретикулум синтезирует вещества, которые экспортируются из клетки для нужд всего организма (нейромедиаторы, гормоны, ферменты), с другой – свободные рибосомы и полисомы производят вещества, восполняющие и обновляющие цитоплазму самой клетки. Расстройство этой функции наблюдается при всех болезнях, но главным образом нарушения возникают при повреждении эндокринной системы.

**2. Энергетическая функция** – любая работа клетки сопровождается затратой энергии. Энергетический аппарат представлен митохондриями, описанными Бенда в 1902. Митохондрии играют центральную роль в энергетическом метаболизме клетки. Дисфункция митохондрий вызывает нейродегенеративные заболевания и митохондриальные болезни. Они лабильны, подвижны, быстро повреждаются и быстро адаптируются. Митохондрии осуществляют синтез АТФ, происходящий в результате процессов окисления органических субстратов и фосфорилирования АДФ. Митохондрия имеет поверхность, образованную наружной и внутренней мембраной. Внутренняя мембрана формирует кристы, погруженные в матрикс митохондрии. На кристах, которые у человека в большинстве клеток пластинчатые, имеются мелкие, грибовидные элементарные единицы, величиной около 10 нм. Каждая субъединица состоит из основания, шейки и головки. В основании находятся первый и второй комплексы с НАД (никотинамидадениндинуклеотид) и FAD (флавинадениндинуклеотид), в шейке третий комплекс с цитохромами *b* и *c*, в головке четвертый комплекс с цитохромами *a*<sub>1</sub>-*a*<sub>3</sub>, совокупность которых называют цитохромоксидазой. По мембране этих комплексов проходит поток электронов и протонов.

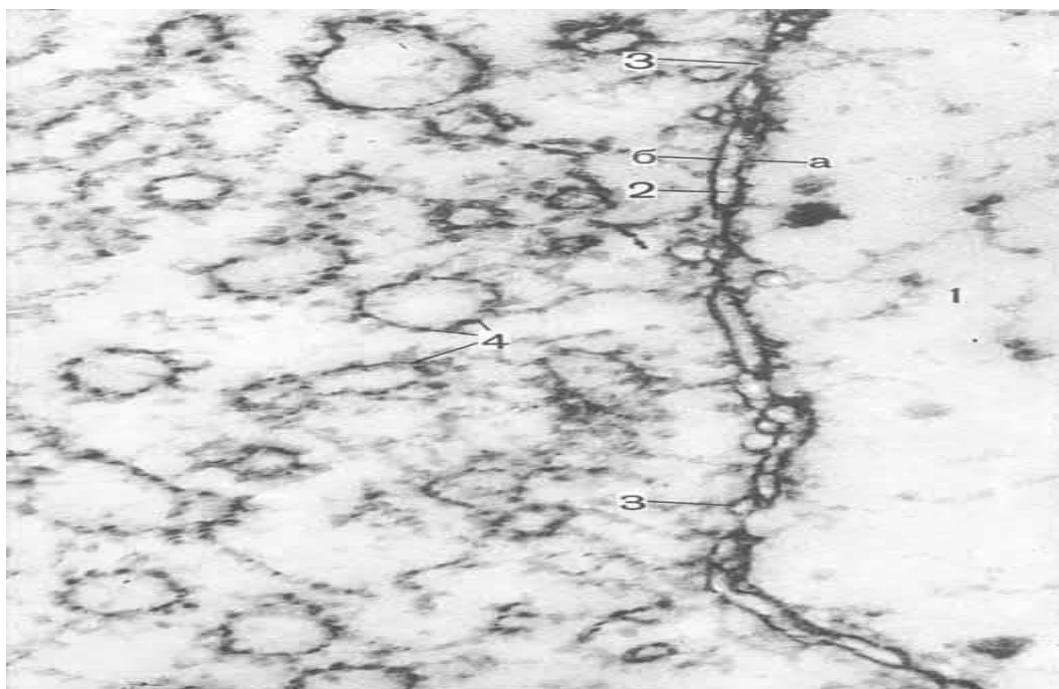
**3. Регуляторная функция** – целиком зависит от генома клетки и отвечает за правильный ход метаболических процессов. Нарушение этой функции приводит к генетическим или хромосомным болезням.

В ядре клетки путем транскрипции с ДНК синтезируются три типа РНК (рибосомальная, матричная и транспортная-РНК), которые и регулируют образование белков в клетке. Рибосомальная РНК образуется в сетчатой части ядрышка и формирует малую субъединицу рибосомы. Ядрышко рассматривается, как самый крупный хромосомный пуф, образованный у человека генами 13, 14, 15, 21 и 22-й хромосом. Периферическая гранулярная часть ядрышка представляет собой группу синтезированных рибосомальных субъединиц, которые мигрируют в цитоплазму через ядерные поры в кариолементе. Информационная РНК списывается с ДНК с помощью полимеразы, а затем мигрирует в цитоплазму и становится для рибосомы цитоплазматическим кодоном. Взаимодействуя с малой единицей рибосомы, она транслирует на нее информацию о синтезе соответствующего пептида. Третий тип – транспортная низкомолекулярная РНК. Она постоянно находится в цитоплазме. Т-РНК специфична относительно аминокислот. Количество т-РНК соответствует количеству аминокислот – 20. Каждая т-РНК имеет два функционально различных конца: один – антикодон и он комплементарен кодону м-РНК, другой конец т-РНК присоединяет к себе соответствующую аминокислоту. Таким образом, в цитоплазме клетки создается временная структура – матрица, или единица синтеза белка, которая состоит из и-РНК, кодирующей ее состав, рибосомы, производящей сборку, и т-РНК, поставляющей аминокислоты.

Таким образом, **клетка представляет собой систему биологических мембран, которые разделяют ее на компартменты (органеллы), выполняющие специальные функции, взаимодействие которых и обеспечивает метаболизм.**



а



б

Рис. 31. Мембрана клетки. Схема (а) и электронограмма (б).

**Органеллы и их классификация.** Органеллы – постоянно присутствующие в цитоплазме клетки структуры, специализированные на выполнении определенных функций. Они подразделяются на органеллы общего значения (1) и специальные органеллы (2):

1. Общие органеллы имеются во всех клетках и необходимы для обеспечения их жизнедеятельности – митохондрии, рибосомы, эндоплазматическая



сеть, комплекс Гольджи, лизосомы, пероксисомы, клеточный центр, структуры цитоскелета.

Митохондрия – это спиральная, округлая, вытянутая или разветвленная органелла. Впервые понятие митохондрия было предложено Бенда в 1897 г.

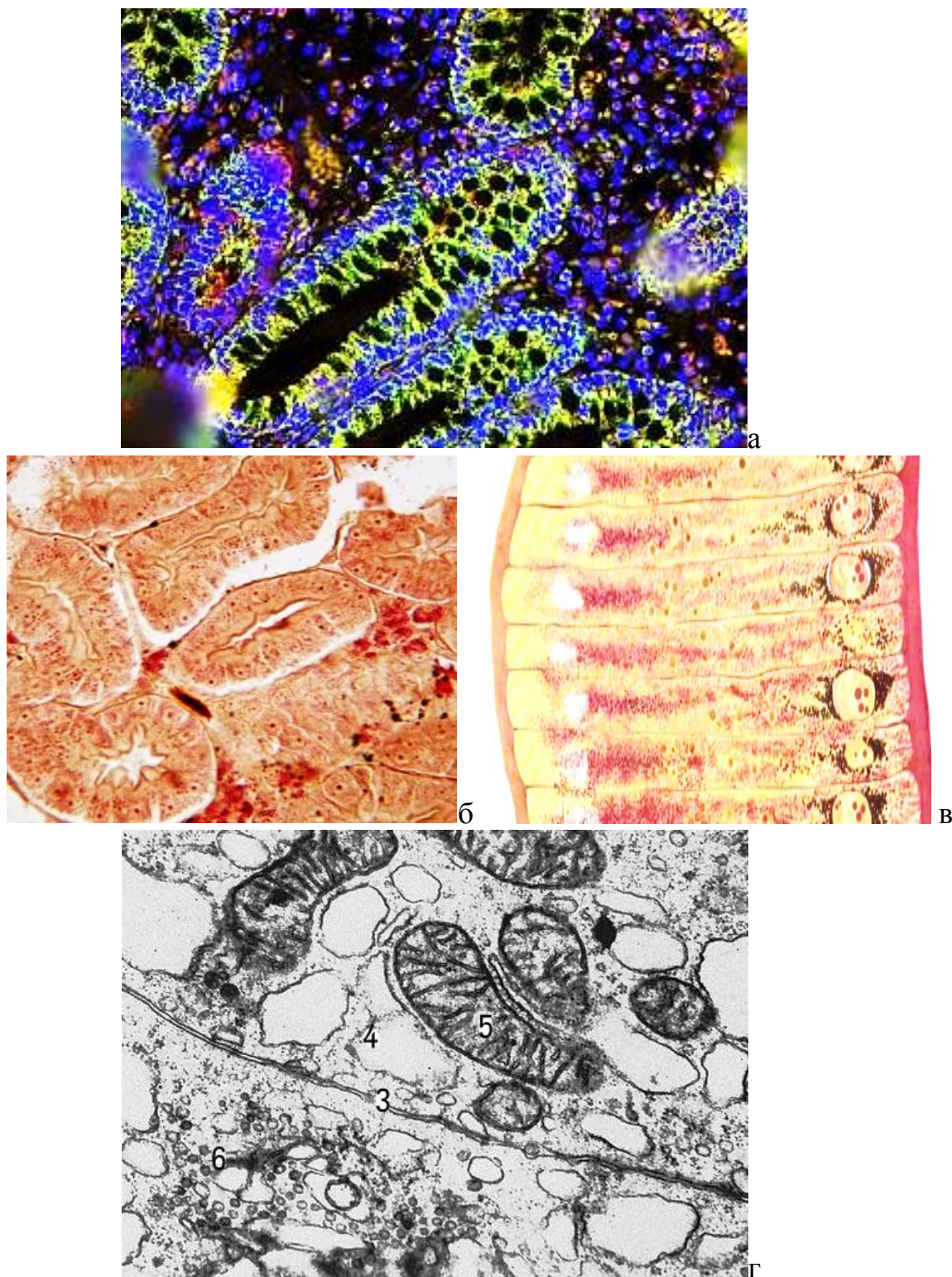


Рис. 32. Митохондрии в эпителиоцитах (А-в – светоптический уровень). Г – электронограмма. А) Иммунная гистохимия. Б, в – окраска по Альтману.

Митохондрии можно обнаружить в живых клетках с помощью фазово-контрастной и интерференционной микроскопии в виде зерен, гранул или нитей. Это довольно подвижные структуры, которые могут перемещаться, сливаться друг с другом, делиться. При окраске специальными методами в погибших клетках при световой микроскопии митохондрии имеют вид мелких зерен (гранул), диффузно распределенных в цитоплазме или концентрирующихся в каких-то определенных ее зонах. В результате разрушения глюкозы и жиров в присутствии кислорода в митохондриях образуется энергия, а органические вещества превращаются в воду и диоксид углерода. Именно таким образом получают основную энергию, необходимую для жизнедеятельности, животные организмы. Энергия накапливается в аденозинтрифосфате (АТФ), а точнее, в его макроэргических связях. Функция митохондрий тесно связана с окислением органических соединений и использованием освобождающейся при их распаде энергии для синтеза молекул АТФ. Поэтому митохондрии часто называют энергетическими станциями клетки, или органеллами клеточного дыхания. АТФ выполняет функцию поставщика энергии, перенося одну из своих богатых энергией концевых фосфатных групп на другую молекулу, и превращается при этом в АДФ. Предполагают, что в эволюции митохондрии были прокариотическими микроорганизмами, которые стали симбионтами в организме древней клетки. В последующем они стали жизненно необходимы, что было связано с увеличением содержания кислорода в атмосфере Земли. С одной стороны, митохондрии удаляли избыток токсичного для клетки кислорода, а с другой – обеспечивали энергией. Без митохондрий клетка практически не в состоянии использовать кислород как вещество, обеспечивающее поставку энергии, и может восполнять свои энергетические потребности лишь путем анаэробных процессов. Таким образом, кислород – это яд, но яд жизненно важный для клетки, причем избыток кислорода так же вреден, как и его недостаток. Митохондрии могут изменять свою форму и перемещаться в те области клетки, где потребность в них наиболее высока. Так, в кардиомиоцитах митохондрии находятся вблизи миофибрилл, в клетках почечных канальцев вблизи базальных впячиваний и т. д. В клетке содержится до тысячи митохондрий, и их количество зависит от активности клетки. Митохондрии имеют средние поперечные размеры 0,5...3 мкм. В зависимости от размеров выделяют мелкие, средние, крупные и гигантские митохондрии (формируют разветвленную сеть – митохондриальный ретикулум). Размеры и число митохондрий тесно связаны с активностью клетки и ее энергопотреблением. Они крайне изменчивы и в зависимости от активности клетки, содержания кислорода, гормональных влияний могут набухать, изменять число и структуру крист, варьировать в числе, форме и размерах, а также ферментативной активности. Объемная плотность митохондрий, степень

развития их внутренней поверхности и другие показатели зависят от энергетических потребностей клетки. В лимфоцитах имеется всего по несколько митохондрий, а в печеночных клетках их 2...3 тыс. Митохондрии состоят из матрикса, внутренней мембраны, перимитохондриального пространства и наружной мембраны. Наружная митохондриальная мембрана отделяет органеллу от гиалоплазмы. Обычно она имеет ровные контуры и замкнута так, что представляет собой мембранный мешок. Внешнюю мембрану от внутренней отделяет перимитохондриальное пространство шириной около 10...20 нм. Внутренняя митохондриальная мембрана ограничивает собственно внутреннее содержимое митохондрии – матрикс. Внутренняя мембрана образует многочисленные выпячивания внутрь митохондрий, которые имеют вид плоских гребней, или крист. По форме кристы могут иметь вид пластинок (трабекулярные) и трубочек (мультивезикулярные на срезе), а направлены они продольно или поперечно по отношению к митохондрии. Каждая митохондрия заполнена матриксом, который на электронных микрофотографиях выглядит плотнее, чем окружающая цитоплазма. Матрикс митохондрии однородный (гомогенный), иногда мелкозернистый, различной электронной плотности. В нем выявляют тонкие нити толщиной около 2...3 нм и гранулы размером около 15...20 нм. Нити матрикса представляют собой молекулы ДНК, а мелкие гранулы – митохондриальные рибосомы. В матриксе содержатся ферменты, одна одноцепочечная, циклическая ДНК, митохондриальные рибосомы, много ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Автономная система белкового синтеза митохондрий представлена молекулами ДНК, свободными от гистонов. ДНК короткая, имеет форму кольца (циклическая) и содержит 37 генов. В отличие от ядерной ДНК в ней практически нет некодирующих последовательностей нуклеотидов. Особенности строения и организации сближают ДНК митохондрий с ДНК бактериальных клеток. На ДНК митохондрий происходит синтез молекул РНК разных типов: информационных, трансфертных (транспортных) и рибосомальных. Информационная РНК митохондрий не подвергается сплайсингу (вырезанию участков, не несущих информационной нагрузки). Малые размеры молекул митохондриальных ДНК не могут определить синтез всех белков митохондрий. Большинство белков митохондрий находится под генетическим контролем клеточного ядра и синтезируется в цитоплазме, так как ДНК митохондрий слабо выражена и может обеспечить образование лишь части ферментов цепи окислительного фосфорилирования. Митохондриальная ДНК кодирует не более десяти белков, которые локализованы в мембранах и представляют собой структурные белки, ответственные за правильную интеграцию отдельных функциональных белковых комплексов митохондриальных мембран. Синтезируются также белки, осуществляющие транспортные функции. Такая система белкового синтеза не обеспечивает всех

функций митохондрии, поэтому автономия митохондрий ограниченная и относительная. У млекопитающих митохондрии при оплодотворении передаются лишь через яйцеклетку, а спермий привносит в новый организм ДНК ядра. В матриксе митохондрий образуются рибосомы, отличающиеся от рибосом цитоплазмы. Они участвуют в синтезе ряда митохондриальных белков, не кодируемых ядром. Митохондриальные рибосомы имеют число седиментации 60 (в отличие от цитоплазматических с числом седиментации 80). Число седиментации – это скорость осаждения при центрифугировании и ультрацентрифугировании. По строению митохондриальные рибосомы близки к рибосомам прокариотических организмов, но меньшего размера и отличаются чувствительностью к определенным антибиотикам (левомецитину, тетрациклину и др.). Внутренняя мембрана митохондрии обладает высокой степенью избирательности при транспорте веществ. К ее внутренней поверхности прикрепляются тесно прилежащие друг к другу ферменты цепи окислительного фосфорилирования, белки-переносчики электронов, транспортные системы АТФ, АДФ, пируват и др. В результате тесного расположения ферментов на внутренней мембране обеспечивается высокая сопряженность (взаимосвязанность) биохимических процессов, повышающая скорость и эффективность каталитических процессов. При электронной микроскопии выявляют грибовидные частицы, выступающие в просвет матрикса. Они обладают АТФ-синтетичной (образует АТФ из АДФ) активностью. Транспорт электронов идет по дыхательной цепи, локализованной во внутренней мембране, которая содержит четыре крупных ферментных комплекса (цитохромы). При прохождении электронов по дыхательной цепи ионы водорода откачиваются из матрикса в перимитохондриальное пространство, что обеспечивает формирование протонного градиента (помпы). Энергия этого градиента (различия в концентрации веществ и формирование мембранного потенциала) используется для синтеза АТФ и транспорта метаболитов и неорганических ионов. Содержащиеся на внутренней мембране белки-переносчики транспортируют через нее органические фосфаты, АТФ, АДФ, аминокислоты, жирные кислоты, три – и дикарбоновые кислоты. Наружная мембрана митохондрии более проницаема для низкомолекулярных веществ, так как в ней много гидрофильных белковых каналов. На наружной мембране располагаются специфические рецепторные комплексы, через которые белки из матрикса транспортируются в перимитохондриальное пространство. По своему химическому составу и свойствам наружная мембрана близка к другим внутриклеточным мембранам и плазмолемме. В ней содержатся ферменты, метаболизирующие жиры, активирующие (катализирующие) превращения аминов, аминоксидаза. Если ферменты наружной мембраны сохраняют активность, то это показатель функциональной сохранности митохондрий. В митохондриях име-



ются два автономных субкомпартамента. Вели перимитохондриальное пространство, или наружная камера митохондрии (внешний субкомпартамент), формируется за счет проникновения белковых комплексов гиалоплазмы, то внутренний субкомпартамент (матрикс митохондрии) частично образован за счет синтетической активности митохондриальной ДНК. Во внутреннем субкомпартаменте (матриксе) содержатся ДНК, РНК и рибосомы. Он отличается высоким уровнем ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в сравнении с гиалоплазмой. Во внешнем субкомпартаменте накапливаются ионы водорода. Ферментативная активность внешнего и внутреннего субкомпартаментов, состав белков сильно различаются. Внутренний субкомпартамент имеет более высокую электронную плотность, чем внешний. Специфические маркеры митохондрий – ферменты цитохром-оксидаза и сукцинатдегидрогеназа, выявление которых позволяет количественно охарактеризовать энергетические процессы в митохондриях. Основная функция митохондрий – синтез АТФ. Вначале в гиалоплазме разрушаются сахара (глюкоза) до молочной и пировиноградной кислот (пирувата) с одновременным синтезом небольшого количества АТФ. В результате гликолиза одной молекулы глюкозы используется две молекулы АТФ, а образуется четыре. Таким образом, положительный баланс составляют всего две молекулы АТФ. Эти процессы совершаются без кислорода (анаэробный гликолиз). Все последующие этапы выработки энергии происходят в процессе аэробного окисления, который обеспечивает синтез большого количества АТФ. При этом органические вещества разрушаются до  $\text{CO}_2$  и воды. Окисление сопровождается переносом протонов на их акцепторы. Эти реакции осуществляются с помощью ряда ферментов цикла трикарбоновых кислот, которые находятся в матриксе митохондрии. В мембраны крист встроены системы переноса электронов и сопряженного с ним фосфорилирования АДФ (окислительное фосфорилирование). При этом происходит перенос электронов от одного белка-акцептора электронов к другому и, наконец, связывание их с кислородом, вследствие чего образуется вода. Одновременно с этим часть энергии, выделяемой при таком окислении в цепи переноса электронов, запасается в виде макроэргической связи при фосфорилировании АДФ, что приводит к образованию большого числа молекул АТФ – основного внутриклеточного энергетического эквивалента. На мембранах крист митохондрий происходит процесс окислительного фосфорилирования с помощью расположенных здесь белков цепи окисления и фермента фосфорилирования АДФ АТФ-синтазы. В результате окислительного фосфорилирования из одной молекулы глюкозы образуется 36 молекул АТФ. К некоторым гормонам и веществам на митохондриях имеются специализированные (аффинные) рецепторы. Трийодтиронин в норме ускоряет синтетическую активность митохондрий. Интерлейкин-1 и высокие концентрации трийодтиро-

нина разобщают цепи окислительного фосфорилирования, вызывают набухание митохондрий, что сопровождается увеличением образования тепловой энергии. Новые митохондрии образуются путем деления, перетяжкой или почкованием. В последнем случае образуется протомитохондрия, постепенно увеличивающаяся в размерах. Протомитохондрия – мелкая органелла с наружной и внутренней мембранами. Внутренняя мембрана не имеет или содержит слабо развитые кристы. Органелла характеризуется низким уровнем аэробного фосфорилирования. При образовании перетяжки содержимое митохондрии распределяется между двумя новыми довольно крупными органеллами. При любом способе размножения в каждой из вновь образующихся митохондрий имеется собственный геном. Старые митохондрии разрушаются путем аутолиза (самопереваривания клеткой с помощью лизосом) с образованием аутолизосом. Из аутолизосомы образуется остаточное тельце. При полном переваривании содержимое остаточного тельца, состоящее из низкомолекулярных органических веществ, выводится путем экзоцитоза. При неполном переваривании остатки митохондрий могут накапливаться в клетке в виде слоистых телец или гранул с нипофусцином. В части митохондрий накапливаются нерастворимые соли кальция с образованием кристаллов – кальцинатов. Накопление продуктов дегенерации митохондрий может привести к дистрофии клетки.

(Источник: <http://www.activestudy.info/mitoxondriya/>)

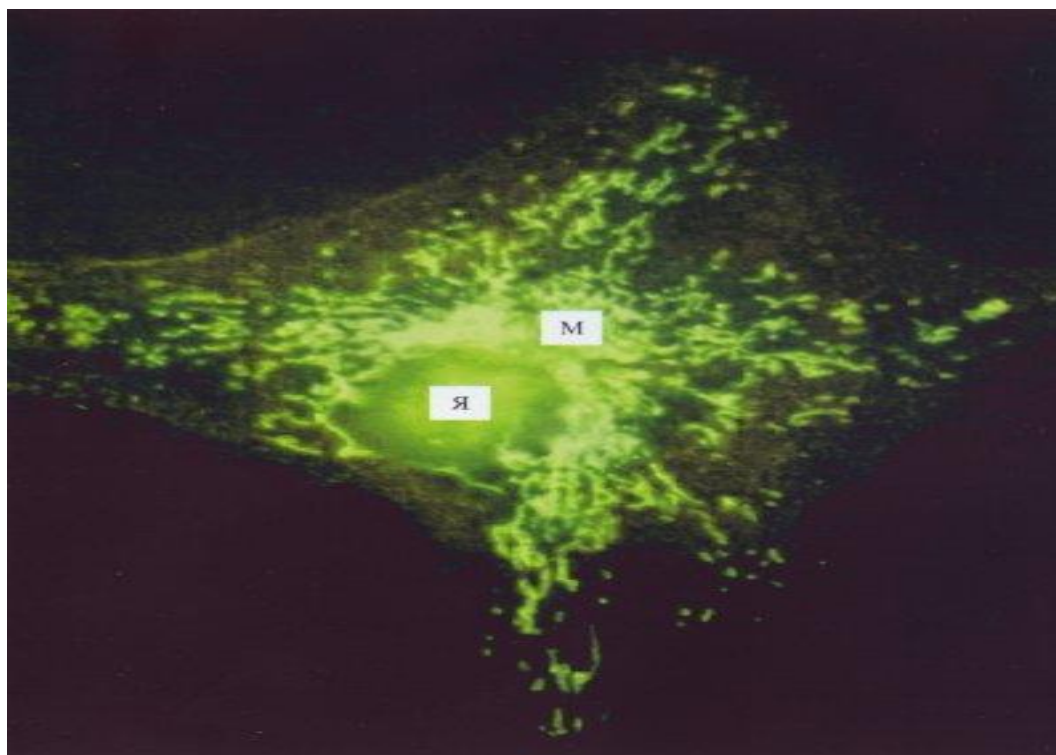


Рис. 33. Флуоресцирующие митохондрии (М) в клетке культуры ткани при окраске родамином (фото А.А. Минина).

**Рибосомы.** Рибосома представляет собой элементарную клеточную машину синтеза любых белков клетки. Все они построены в клетке одинаково, имеют одинаковую молекулярную композицию, выполняют одинаковую функцию – синтез белка – поэтому их можно так же считать клеточными органоидами. В отличие от других органоидов цитоплазмы (пластид, митохондрий, клеточного центра, мембранной вакуолярной системы и др.) они представлены в клетке огромным числом: за клеточный цикл их образуется  $1 \times 10^7$  штук. Поэтому основная масса клеточной РНК представляет собой именно рибосомную РНК. РНК рибосом относительно стабильна, рибосомы могут существовать в клетках культуры ткани в течение нескольких клеточных циклов. В печеночных клетках время полужизни рибосом составляет 50-120 часов.

Рибосомы – это сложные рибонуклеопротеидные частицы, в состав которых входит множество молекул индивидуальных (неповторенных) белков и несколько молекул РНК. Рибосомы прокариот и эукариот по своим размерам и молекулярным характеристикам отличаются, хотя и обладают общими принципами организации и функционирования. К настоящему времени методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения полностью расшифрована структура рибосом.

Полная, работающая рибосома, состоит из двух неравных субъединиц, которые легко обратимо диссоциируют на большую субъединицу и малую. Размер полной прокариотической рибосомы составляет  $20 \times 17 \times 17$  нм, эукариотической –  $25 \times 20 \times 20$ . Полная прокариотическая рибосома имеет коэффициент седиментации 70S и диссоциирует на две субъединицы: 50S и 30S. Полная эукариотическая рибосома, 80S рибосома, диссоциирует на 60S и

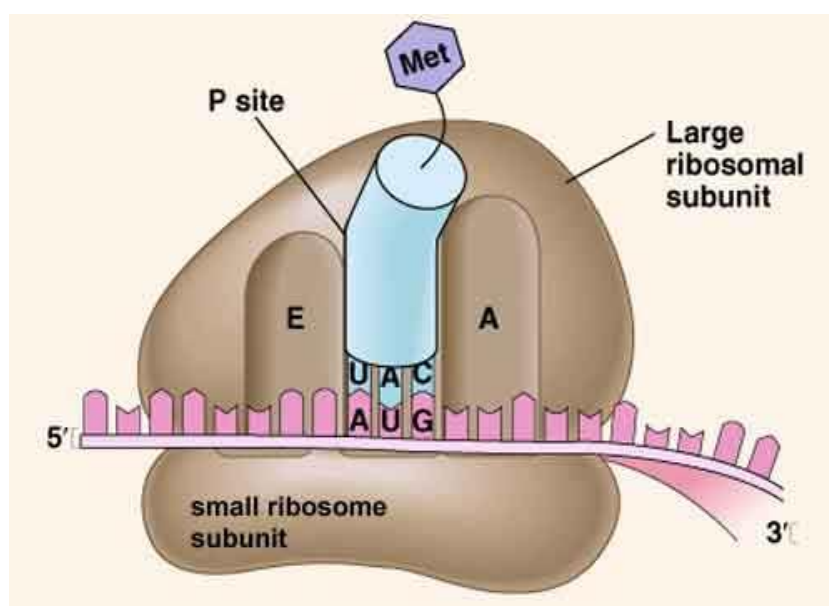


Рис. 34. Схема рибосом

40S субъединицы. Форма и детальные очертания рибосом из разнообразных организмов и клеток, включая как прокариотические, так и эукариотические, поразительно похожи, хотя и отличаются рядом деталей. Малая рибосомная субъединица имеет палочковидную форму с несколькими небольшими выступами (см. рис. 81), ее длина составляет около 23 нм, а ширина – 12 нм. Большая субъединица похожа на полусферу с тремя торчащими выступами. При ассоциации в полную 70S рибосому малая субчастица ложится одним концом на один из выступов 50S частицы, а другим в ее желобок. В состав малых субъединиц входит по одной молекуле РНК, а в состав большой – несколько: у прокариот – две, а у эукариот – 3 молекулы. В состав эукариотической рибосомы входят четыре молекулы РНК разной длины: 28S РНК содержит 5000 нуклеотидов, 18S РНК – 2000, 5,8S РНК – 160, 5S РНК – 120. Рибосомные РНК обладают сложной вторичной и третичной структурой, образуя сложные петли и шпильки на комплементарных участках, что приводит к самоупаковке, самоорганизации этих молекул в сложное по форме тело. Так, например, сама по себе молекула 18S РНК в физиологических ионных условиях образует палочковидную частицу, определяющую форму малой субъединицы рибосом.

Под действием низких ионных сил, особенно при удалении ионов магния, плотные рибосомные субъединицы могут разворачиваться в рыхлые рибонуклеопротеидные тяжи, где можно наблюдать кластеры отдельных белков, но правильных структур, типа нуклеосом, нет, т.к. нет групп из сходных белков: в рибосоме все 80 белков разные.

Для того, чтобы образовались рибосомы необходимо наличие четырех типов рибосомных РНК в эквимоллярных отношениях и наличие всех рибосомных белков. Сборка рибосом может происходить спонтанно *in vitro*, если последовательно добавлять к РНК белки в определенной последовательности.

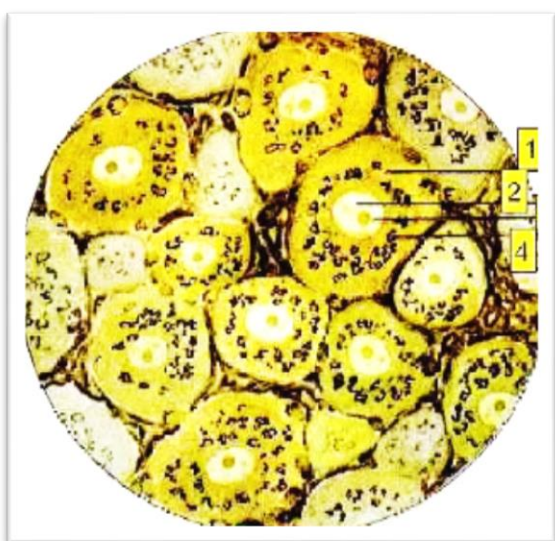
Следовательно, для биосинтеза рибосом необходим синтез множества специальных рибосомных белков и 4-х типов рибосомной РНК. Где эта РНК синтезируется, на каком количестве генов, где эти гены локализованы, как они организованы в составе ДНК хромосом – все эти вопросы в последние десятилетия были успешно разрешены при изучении строения и функции ядрышек.

Впервые **комплекс Гольджи** был обнаружен в нервной клетке в 1898 г. итальянским ученым Гольджи. В последующие годы он был открыт в других клетках разных тканей позвоночных и беспозвоночных животных. В растительных клетках, где существование его долгое время оспаривалось, аппарат Гольджи был найден значительно позже, с помощью электронной микроскопии.

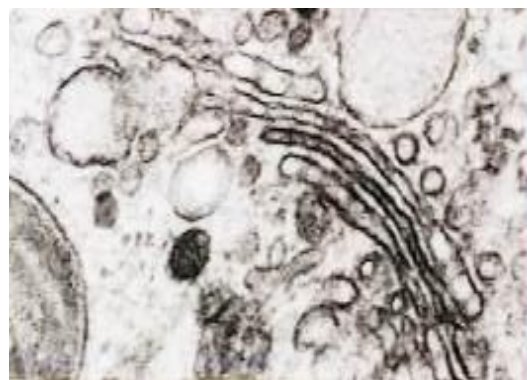
На уровне светового микроскопа аппарат Гольджи выявляется методом импрегнации серебром или солями осмия. Его иногда называют сетчатым аппаратом, так как во многих клетках или в различные моменты функционирования

одной и той же клетки эта структура имеет вид сети. Другие названия данного органоида – комплекс Гольджи, «пластинчатый комплекс» и «внутриклеточный сетчатый аппарат».

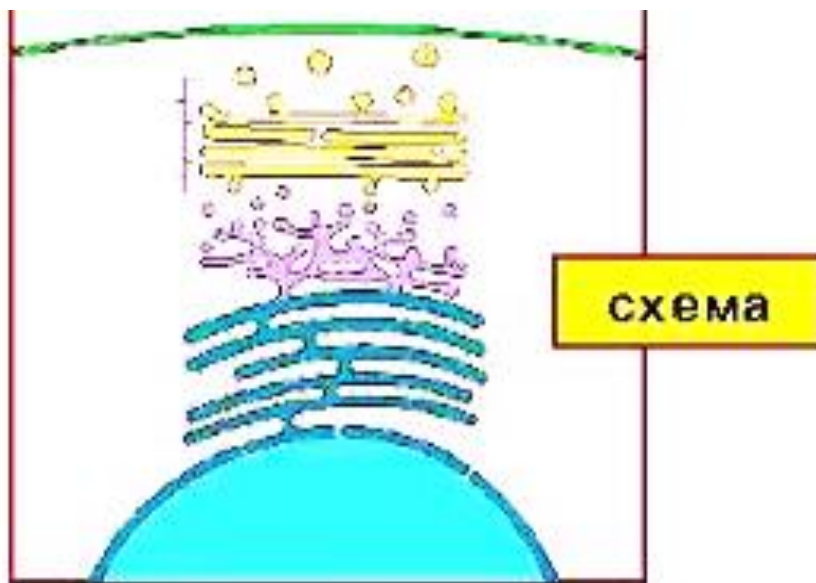
В световом микроскопе различают две основные формы аппарата Гольджи: сетчатую и диктиосомную, говорят также о компактной и диффузной формах данного органоида. Различная форма аппарата Гольджи бывает связана либо с функциональным состоянием клетки, либо со степенью ее дифференцировки, либо с видовой специфичностью. Сетчатая форма комплекса Гольджи локализуется обычно поблизости от ядра, тогда как диктиосомы могут распределяться по цитоплазме клеток по-разному. Диктиосомы представляют собой отдельные фрагменты сети – это тельца или чешуйки разнообразной формы.



а



б



в

Рис. 35. Аппарат Гольджи на световом (а) и электронномикроскопическом (б) уровнях. В-схема.



В растительных клетках, в клетках беспозвоночных животных и в большинстве клеток эмбриональных тканей чаще всего наблюдается диктиосомная форма органоида.

В большинстве тканей взрослого организма животных обычно встречается сетевидная форма аппарата. В неполярных клетках органоид располагается вокруг ядра, в полярных клетках он находится у активной поверхности клетки. Примером клетки, для которой характерны вариации в строении, а также степени развития и локализации комплекса Гольджи в связи с функциональным состоянием, является железистая клетка. Так, в клетках экзокринной части поджелудочной железы до начала выработки секрета аппарат Гольджи бывает сильно развит и локализуется в зоне, прилежащей к ядру. По мере накопления секреторных включений происходит постепенное перемещение элементов аппарата в апикальную часть клетки. После выделения секрета степень развития органоида резко падает.

В последнее время многие исследователи относят аппарат Гольджи к элементам эндоплазматической сети. Это связано с тем, что на уровне электронного микроскопа он представляет собой в основном систему внутриклеточных мембранных структур; вакуолей и цистерн.

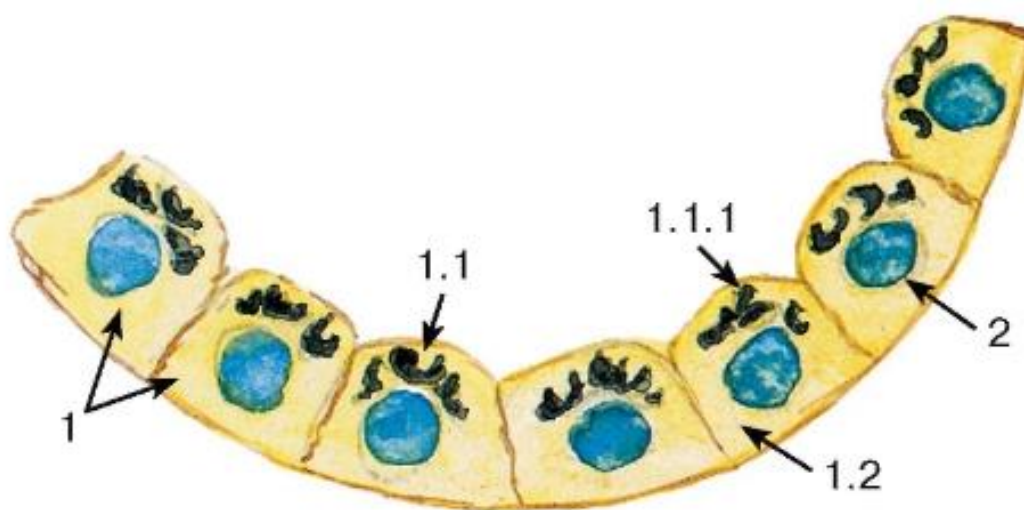


Рис. 36. Комплекс Гольджи на световом уровне.

Анализ ультраструктуры комплекса Гольджи в различных клетках животных и растений показал, что структура его элементов у разных объектов однотипна. В наиболее полном виде она складывается из плоских цистерн, вакуолей различных размеров и мелких пузырьков. Это система бывает связана с эндоплазматической сетью. Все элементы аппарата Гольджи не всегда бывают полностью представлены. Иногда преобладает тот или иной компонент. Чаще всего цистерны комплекса Гольджи расположены группами по 5 – 8 – 12, но число,

размеры, а также расстояние между ними может варьировать в клетках различных тканей, Число и размер вакуолей тоже очень разнообразны.

В состав мембран комплекса Гольджи входят фосфолипиды и белки. Здесь можно обнаружить и незначительное количество ферментов, в частности связанных с синтезом липидов и полисахаридов и, кроме того, некоторые фосфатазы (например, кислая фосфатаза, тиаминпирофосфатаза, нуклеозиддифосфатаза).

Функционально аппарат Гольджи связан с целым рядом важных процессов, происходящих в клетке. Он участвует в секреторной функции клетки. С помощью метода электронной автордиографии было показано, где идет синтез секреторных продуктов и какова их судьба в клетке. В начале процесса выработки секрета секреторный материал синтезируется на рибосомах гранулярного ретикулума. На примере некоторых железистых клеток показано, что синтезированный на рибосомах белковый продукт проникает внутрь гранулярного ретикулума и накапливается в его расширенных участках. Позже он поступает в полости цистерн аппарата Гольджи, где конденсируется и уплотняется. Наконец, отпочковавшись от цистерн аппарата Гольджи и получив таким образом мембрану, синтезированный белок превращается в секреторную гранулу.

Аналогично процессу образования гранул секрета происходит и образование лизосом. Различна лишь судьба этих двух типов структур. Если секреторная гранула выводится из клетки, то лизосома остается и работает внутри клетки.

Таким образом, помимо участия в секретообразовании аппарата Гольджи связан и с формированием аппарата внутриклеточного пищеварения.

Внутриклеточный сетчатый аппарат принимает участие в образовании, накоплении и усвоении липидов и жировых веществ в клетке. Он участвует и в синтезе полисахаридов, в частности тех, которые затем входят в комплекс с белком при образовании мукополисахаридов и гликопротеидов. В яйцеклетках деятельность аппарата Гольджи связана с образованием желточных включений. Таким образом, можно сказать, что комплекс Гольджи ответствен за процесс образования различных внутриклеточных включений.

Следует также отметить, что способность клетки накапливать вещества, подлежащие выведению, также связана с аппаратом Гольджи. Еще в 1947 г. Кедровский отметил процесс накопления различных веществ в зоне Гольджи. Так, если в организм ввести витальные красители, то они накапливаются в системе аппарата Гольджи.

Свойство сегрегировать различные продукты – и те, которые всасываются, и те, которые выводятся, – это общее свойство системы Гольджи, характер-



ное для всех клеток. Мембраны этого органоида изолируют содержимое разнообразных клеточных включений от основной цитоплазмы.

Согласно мнению отдельных исследователей, комплекс Гольджи может рассматриваться и как мембранное депо клетки. Здесь получают мембрану такие структуры, как секреторные гранулы и лизосомы и сюда же возвращаются мембраны пиноцитозных пузырьков и фагосом.

Специальные органеллы имеются лишь в некоторых клетках и обеспечивают выполнение специализированных функций – реснички, жгутики, микроворсинки, миофибриллы, тонофибриллы, нейрофибриллы.

### Схематическое изображение клетки

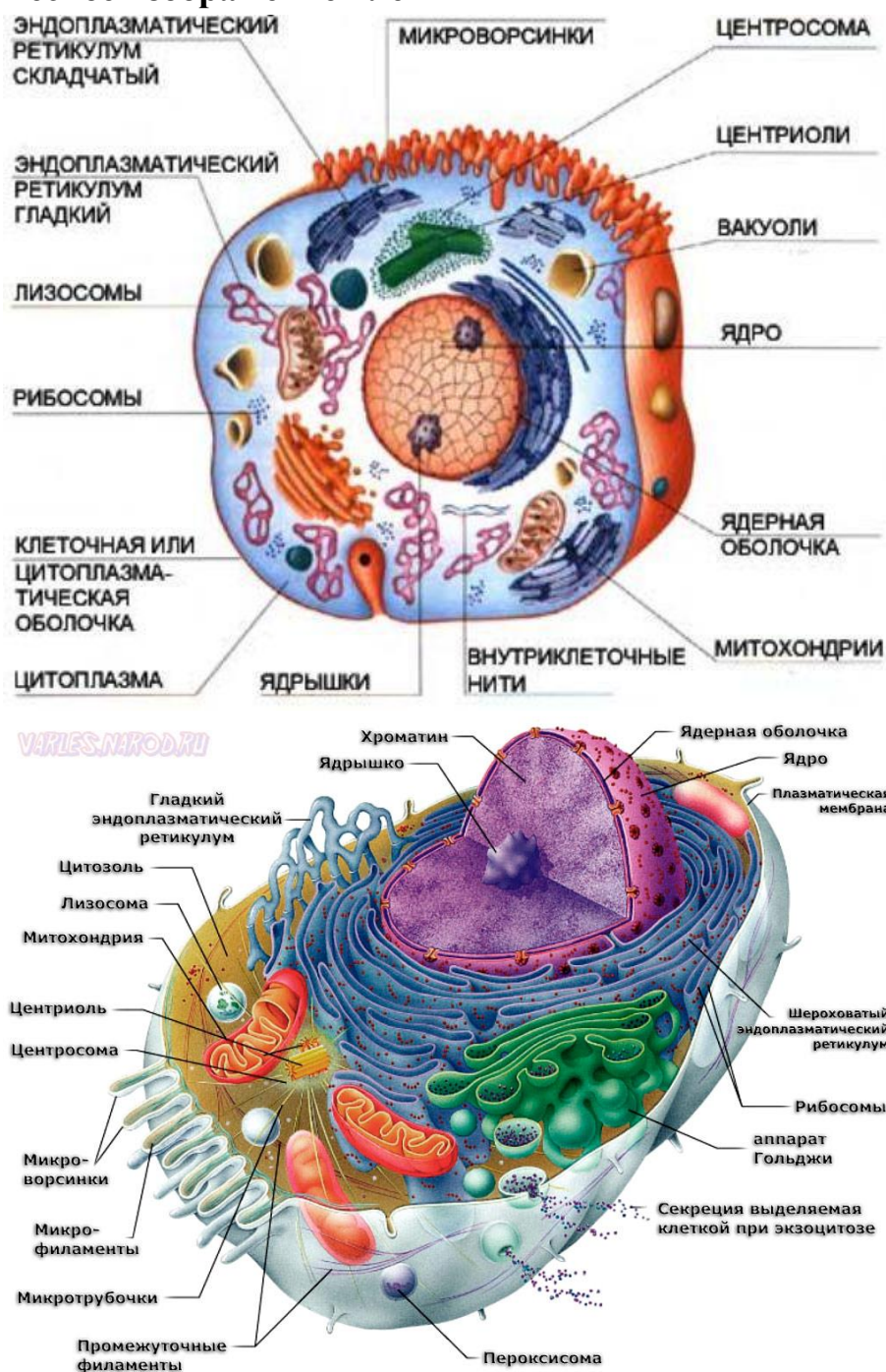
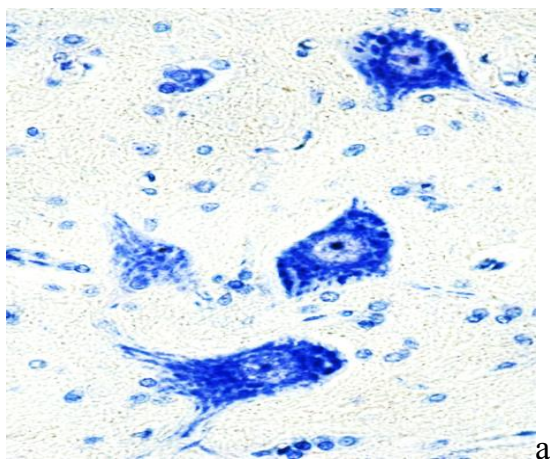
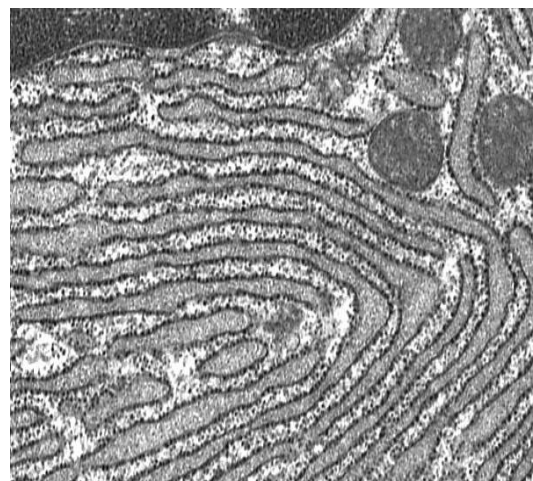


Рис. 37. Ультраструктура клетки. <http://yandex.ru/images/search?img>





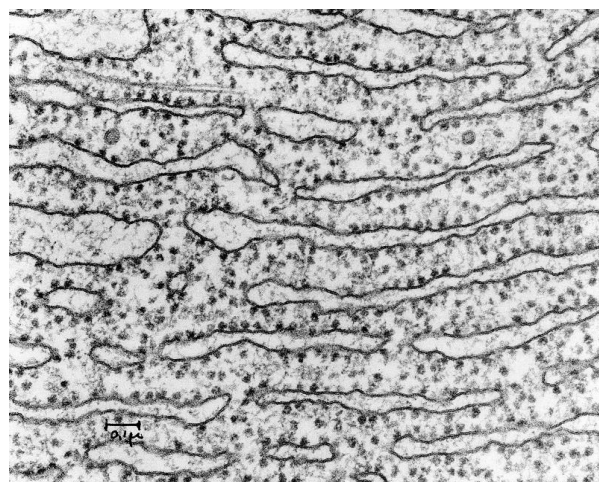
а



б



в



г

Рис. 38. (А-г) ЭПС на световом и электронномикроскопическом уровнях.

Метаболические процессы в клетке проходят в несколько этапов:



Рис. 39. Метаболические процессы в клетке

**1. Поступление веществ в клетку (эндоцитоз).** Существуют различные варианты поступления веществ в клетку – пиноцитоз и фагоцитоз. Под пиноцитозом понимают поступление в клетку воды и растворенных веществ, а фагоцитоз рассматривают как процесс поглощения твердых и объемных материалов. Кроме того имеется несколько видов эндоцитоза: общий или неспецифический – происходит на большей части плазмолеммы, образуются пузырьки покрытые гладкой мембранной; специфический – осуществляется в строго определенных участках плазмолеммы, покрытой со стороны цитоплазмы специальным белком клатрином, в результате формируются окаймленные пузырьки. При специфическом эндоцитозе в клетку поступают липопротеины низкой и очень низкой плотности (ЛПНП). Нарушение специфического эндоцитоза может быть одной из причин в развитии атеросклероза.

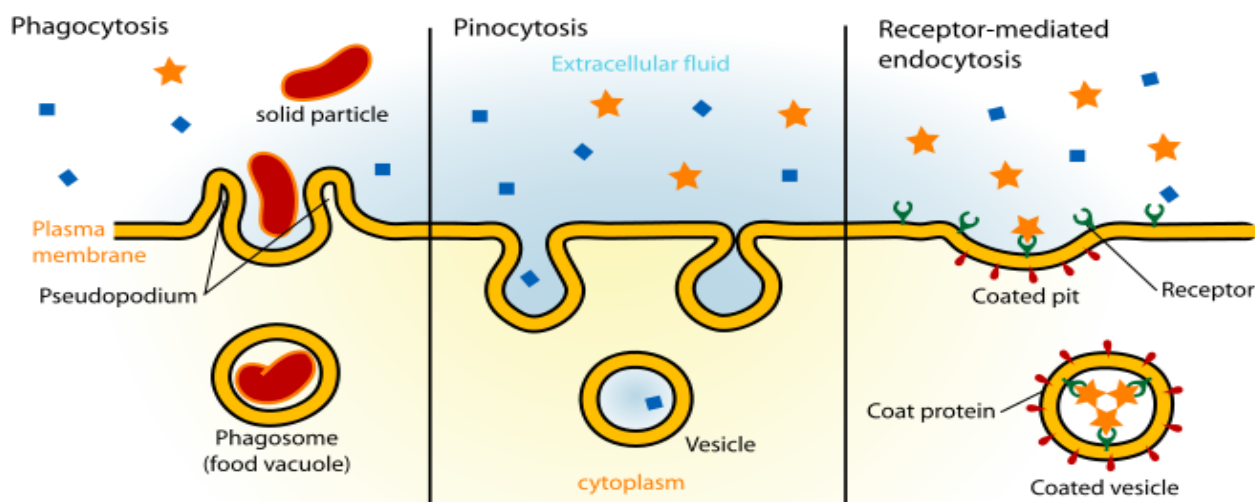


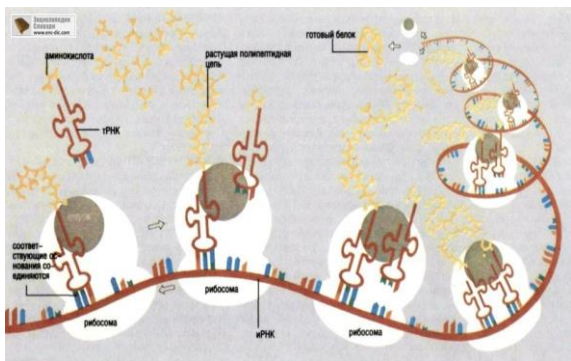
Рис. 40. Эндоцитоз.

**2. Гидролиз макромолекул до мономеров.** Образовавшаяся в результате эндоцитоза фагосома (пиносома) вступает во взаимодействие с первичной лизосомой, в результате образуется вторичная лизосома или пищеварительная вакуоль. Ее гидролазы активно трансформируют материал в мономеры – аминокислоты, жирные кислоты, моносахара, которые легко диффундируют в гиалоплазму. Мономеры являются источником для получения энергии и синтеза простых и сложных белков. Нарушение функции лизосом является причиной болезней накопления (болезнь Тей-Сакса).

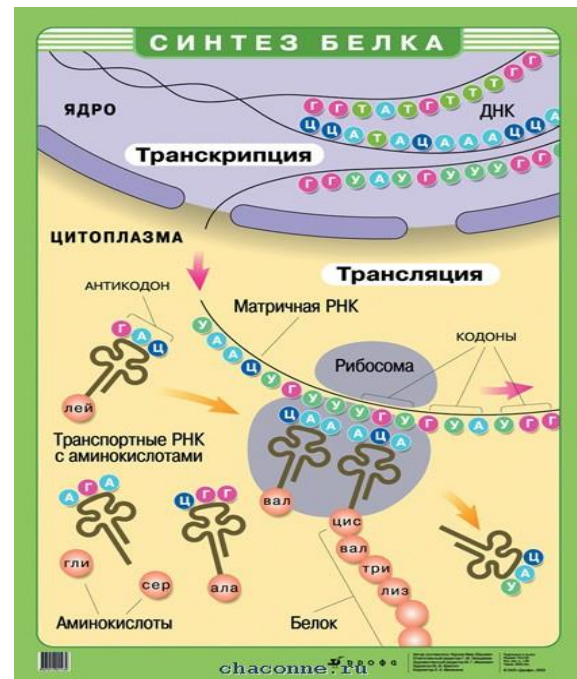
**3. Синтез белков для нужд самой клетки и на экспорт.** Обновление живой материи в клетке происходит за счет синтеза белков, приоритетную роль в котором играет ядро. Исполнительными цитоплазматическими органеллами для воспроизводства белков служат эндоплазматический ретикулум и свободные рибосомы. Гранулярный ретикулум – это система мембранных пузырьков и канальцев с фиксированными на наружной мембране рибосомами. Белки,



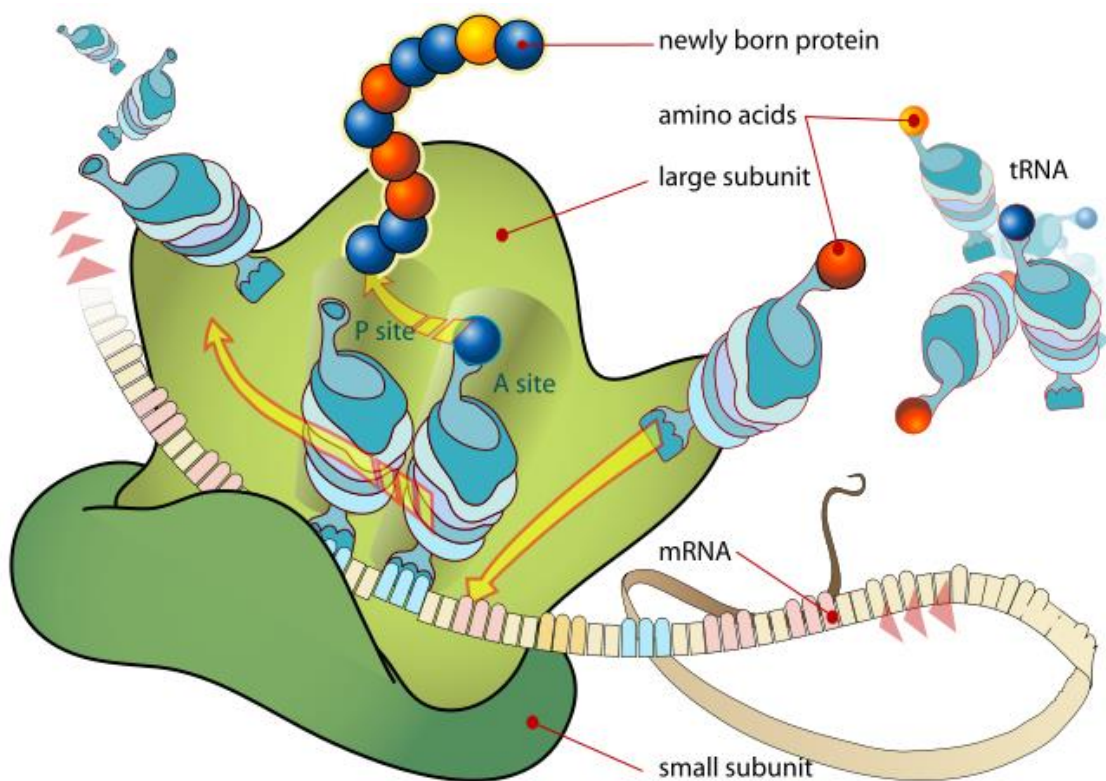
синтезируемые шероховатым ретикулумом предназначены «на экспорт» и имеют значение для функции целого организма. Свободные рибосомы распределены в цитоплазме одиночно, либо собраны в полисомы, имеющие вид разеток. Свободные рибосомы рассматриваются как органеллы, синтезирующие белки для самой клетки. Они преобладают над фиксированными рибосомами в растущих, быстро обновляющихся клетках – нормальных и опухолевых.



а



б



в

Рис. 41. Схема рибосомы и синтеза белка.

Гладкая эндоплазматическая сеть синтезирует липиды и полисахариды, выполняет детоксикационные функции. Количественные соотношения между гладкой и шероховатой сетью могут меняться в зависимости от функциональной профилизации клетки. Синтезированные липиды, полисахариды и белки в виде зимогенных пузырьков мигрируют к аппарату Гольджи, где происходит синтез сложных белков, гликопротеинов и липопротеинов, которые заключаются в пузырьки. Секреторные пузырьки транспортируются к плазмолемме, встраиваются в нее и экзоцитируют содержимое в межклеточную среду. Кроме того, в комплексе Гольджи формируются лизосомы.

**4. Эвакуация метаболитов**, не поддающихся усвоению (телолизосомы или остаточные тельца) и продуктов секреции (секреторные пузырьки) – экзоцитоз.



Рис. 42. Экзоцитоз.

Время лабораторного занятия: 3 часа

#### Хронокарта:

1	Организационная часть с мотивацией темы	5 мин
2	Программированный контроль	10 мин
3	Опрос-беседа	35 мин
4	Объяснение препаратов	10 мин
5	Перерыв	15 мин
6	Контроль за самостоятельной работой студентов. Помощь в работе с препаратами	65 мин
7	Подведение итогов. Проверка альбомов	10 мин



**Мотивационная характеристика темы:** См. учебно-методическую разработку по теме: «Формы организации живой материи. Цитоплазма и ядро клетки».

**Учебная цель**

**Общая цель** – знать классификацию, строение и функции органелл клетки. Знать происхождение и классификацию клеточных включений.

**Конкретная цель** – 1. Основные функции клетки. 2. Синтетический аппарат клетки: ГЭРЛ – система и поток мембран в клетке. 3. Энергетическая функция митохондрий. 4. Регуляция синтеза белка в клетке.

**Необходимый исходный уровень знаний**

**Из других предметов и предшествующих тем:**

Строение и значение ядра.

Строение и функции клеточной поверхности.

Строение и функции цитоплазмы.

Биологические мембраны.

Общая морфология клетки.

Клеточная теория.

**Из темы текущего занятия:**

Классификация органелл.

Строение и функции органелл.

Клеточные включения.

**Вопросы для самоподготовки**

1. Основные функции клетки

2. Синтетический аппарат клетки: ГЭРЛ – система и поток мембран в клетке

3. Энергетическая функция митохондрии

4. Регуляция синтеза белков

**Рекомендации для работы на занятии**

**Задание 1. Научиться различать базофильную субстанцию.**

**Объект изучения** – Препарат: поперечный срез спинного мозга (окр. по Нисслю).

**Программа действий** – На малом увеличении найти крупные мультиполярные клетки (1), на большом увеличении – ядро (2), ядрышко (3), базофильную субстанцию (4).

**Ориентировочные основы действий** – Увидеть мультиполярные клетки (1) звездчатой формы выделяющиеся голубой окраской на бледном фоне среза, в центре клетки округлое бледное ядро (2) с более тёмным ядрышком (3), в цитоплазме – базофильную субстанцию (4) в виде тёмно – голубых глыбок.

## **Задание 2. Научиться различать митохондрии.**

**Объект изучения** – Препарат: срез почки (окр. по Альтману).

**Программа действий** – На малом увеличении найти клетки эпителия извитых канальцев почки (1), на большом увеличении ядро (2), ядрышко (3), митохондрии (4).

**Ориентировочные основы действий** – Увидеть эпителиальные клетки (1) ограничивающие просвет извитых канальцев, в центре клетки светлое ядро (2) с более тёмным ядрышком (3). На фоне светлой цитоплазмы увидеть митохондрии (4) нитевидной и палочковидной формы, темно-красного цвета, рассеянные по всей цитоплазме.

## **Задание 3. Научиться различать аппарат Гольджи.**

**Объект изучения** – Препарат спинномозгового узла (окр. осмиевой кислотой).

**Программа действий** – На малом увеличении найти клетки округлой формы (1), на большом увеличении ядро клетки (2), ядрышко (3), аппарат Гольджи (4).

**Ориентировочные основы действий** – Увидеть округлые клетки зеленоватого цвета (1) в них светло-желтое ядро (2) с более тёмным ядрышком (3). Вокруг ядра в цитоплазме клетки аппарат Гольджи (4) в виде тёмных извитых образований.

## **Задание 4. Зарисовать электроннограмму и схему ультрамикроскопического строения эндоплазматической сети.**

## **Задание 5. Зарисовать электроннограмму и схему ультрамикроскопического строения митохондрии.**

## **Задание 6. Зарисовать электроннограмму и схему ультрамикроскопического строения аппарата Гольджи.**

### **Ситуационные задачи**

Поджелудочная железа выделяет белковый секрет. Какой тип эндоплазматической сети преобладает в клетках данного органа?

В результате действия ионизирующего излучения в некоторых клетках имеет место разрушение отдельных органелл. Каким образом будут утилизироваться клеткой их остатки?

В области раневой поверхности появляется большое количество клеток, содержащих лизосомы, фагосомы. В чем заключается функциональное значение этих клеток?

В процессе жизнедеятельности клеток резко увеличивается число цистерн и канальцев агранулярной эндоплазматической сети. Синтез каких веществ активизируется в клетке?

В каких клетках имеется гранулярная и агранулярная эндоплазматическая сеть?

Какими свойствами обладает клетка, содержащая в цитоплазме большое количество свободных рибосом?

### **Техническое обеспечение учебного процесса**

1. Тестовый контроль с использованием пакета компьютерных программ;  
2. Обеспечение иллюстративной части занятия наглядными пособиями (стенды, таблицы, электроннограммы, презентация органелл в картинках) с использованием мультимедиа (Multimedia Projector DV – thenter);  
3. Микроскопы  
4. Наборы учебных и демонстрационных препаратов.

**Домашнее задание** – см. учебно-методическую разработку лабораторных занятий для студентов по теме: **«Способы репродукции клеток. Реакция клетки на повреждение».**

## ТЕМА 5. СПОСОБЫ РЕПРОДУКЦИИ КЛЕТОК. РЕАКЦИЯ КЛЕТКИ НА ПОВРЕЖДЕНИЕ

### Краткое содержание темы

Смена клеточных популяций обеспечивает в организме рост и развитие, постоянство внутренней среды, процессы выздоровления.

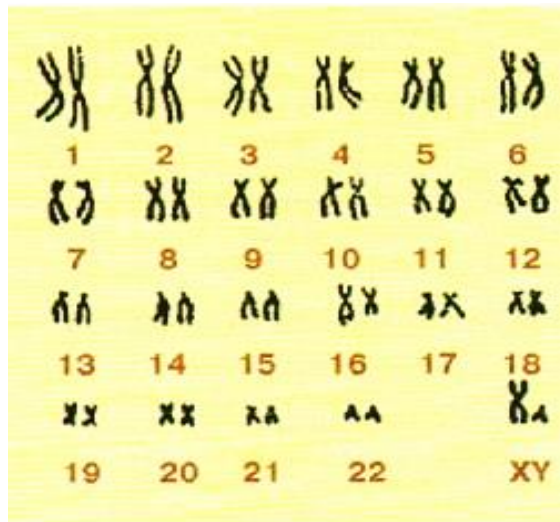
Размножение – это основная физиологическая ось, вокруг которой вращается жизнь вида. Деление клеток рассматривается как форма самодвижения живой материи, ее самосовершенствование. Деление связано с внутренними свойствами самой материи. Морфологическим базисом для осуществления акта репродукции является ядро, которое состоит из следующих компонентов – кариолеммы, хроматина, ядрышка и кариоплазмы. Ведущее значение в сохранении и передаче наследственной информации играет хромосомный набор (кариотип).

**Кариотип** – строго специфичный для каждого вида (по количеству, размерам и форме) набор хромосом. Впервые, термин «хромосома» (окрашенное тельце) предложил Вальдейер в 1880 году. Все хромосомы делятся на соматические (аутосомы) и половые (гетерохромосомы). Шведские ученые Тео и Леван выяснили, что нормальный кариотип человека представлен 46 хромосомами, из них 22 пары аутосом и одна пара половых хромосом (XY у мужчин и XX у женщин), причем Y-хромосома является определяющей в формировании мужского пола. Каждая хромосома под световым микроскопом выглядит в виде палочки, имеющей первичную перетяжку – центромер (кинетохор). Он делит хромосому на два плеча. В зависимости от соотношения длины плеч хромосомы классифицируются на: **метацентрические** – равноплечие; **субметацентрические** – одно плечо незначительно короче другого; **acroцентрические** – одно плечо очень короткое. Иногда на хромосомах есть вторичные перетяжки, которые отделяют от нее маленький участок – сателлит. В области вторичной перетяжки находятся ядрышковые организаторы.

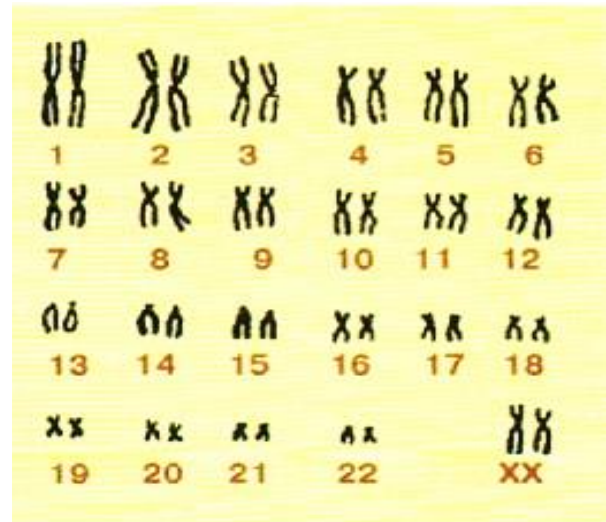
**Клеточный цикл** – это жизнь клетки от одного деления до другого. Он включает в себя два периода: 1. собственно деление (**митоз**) и 2. подготовка к делению (**интерфаза**).

**Интерфаза** гораздо продолжительнее, чем митоз (занимает около 90% клеточного цикла) и подразделяется на три периода: **пресинтетический** (G1), **синтетический** (S) и **постсинтетический** (G2). Пресинтетический период наступает сразу после митоза; длится от нескольких часов до нескольких дней и характеризуется активным ростом клетки, синтезом белка и РНК, благодаря чему клетка достигает нормальных размеров и восстанавливает необходимый набор органелл. В течение этого периода синтезируются особые «запускающие» белки – активаторы S-периода. Они обеспечивают преодоление клеткой

определенного порога – точки рестрикции или ограничения. Если клетка не достигает точки рестрикции, она выходит из цикла и либо вступает в период репродуктивного покоя, либо идет на дифференцировку и дальнейшую специализацию. В синтетический период происходит редупликация ДНК и синтез белков-гистонов; он длится в среднем 8-12 часов. Затем в постсинтетический период осуществляется непосредственная подготовка к митозу: клетка запасается энергией, синтезируются РНК и белки-тубулины, необходимые для формирования веретена деления. Этот период самый короткий, его продолжительность 2-4 часа.



а



б

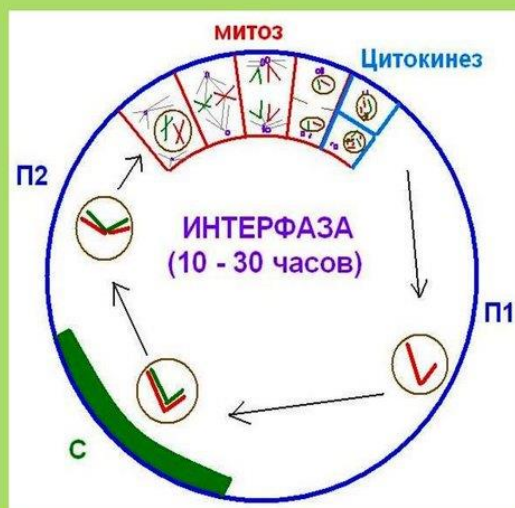


в

Рис. 43. Кариотип здорового человека.  
Кариотип обозначен согласно денверской системе.



## Клеточный цикл



П1- пресинтетический период 2-3 часа  
 С- синтетический период -6-10 часов  
 П2 – постсинтетический период- 2-5 часов

Период существования клетки от одного деления до другого называется **митотическим, или клеточным циклом**.

Клеточный цикл у растений продолжается от 10 до 30 часов. Деление ядра (митоз) занимает около 10% этого времени.

Рис. 44. Клеточный цикл

**Митоз** (непрямое деление) – наиболее универсальный способ репродукции соматической клетки, был открыт и описан немецким гистологом Флеммингом в 1879 году; длится в среднем 1-3 часа и обеспечивает равномерное распределение генетического материала в дочерних клетках. Митоз включает 4 основные фазы: профазу, метафазу, анафазу и телофазу.

В **профазе** происходит спирализация и конденсация хроматина, в результате хромосомы становятся видимыми и состоят из двух лежащих рядом сестринских хроматид; исчезает ядрышко; растворяется ядерная оболочка; начинает формироваться веретено деления.

В **метафазе** окончательно образуется ахроматиновое веретено; хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости в виде материнской звезды; хроматиды расходятся, оставаясь связанными в области центромеры.

В **анафазе** сестринские хроматиды расходятся к полюсам клетки и формируют две дочерние звезды.

И, наконец, в **телофазе** протекают процессы обратные профазе – деспирализация хроматина; восстановление ядерной оболочки вокруг групп дочерних хроматид; появление ядрышка и цитотомия. В итоге, из одной материнской клетки формируются две дочерние, каждая из которых содержит диплоидный набор хромосом.

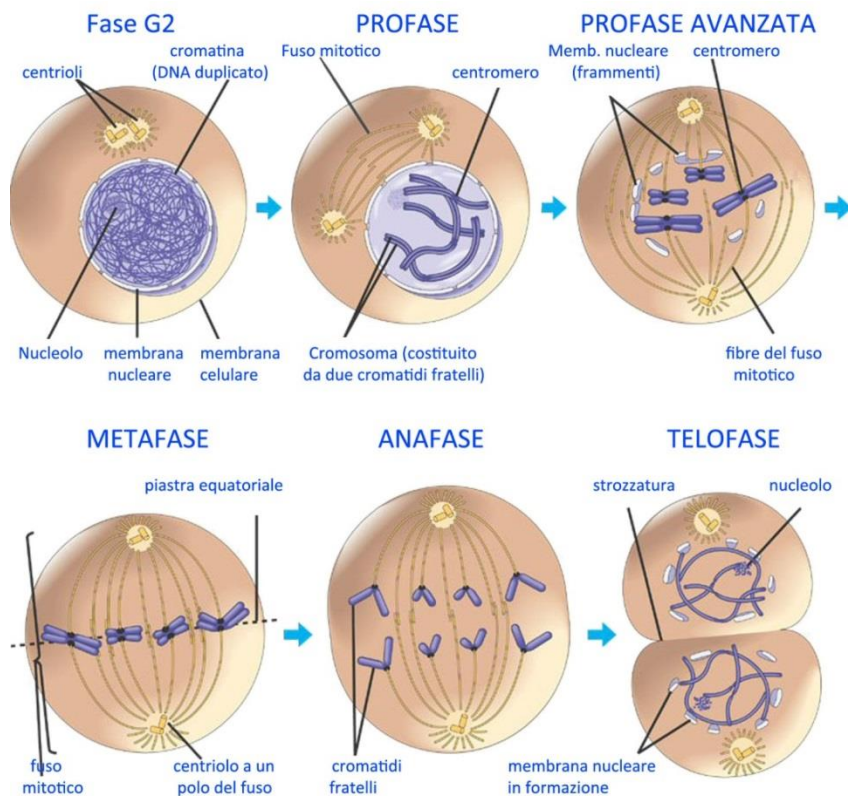
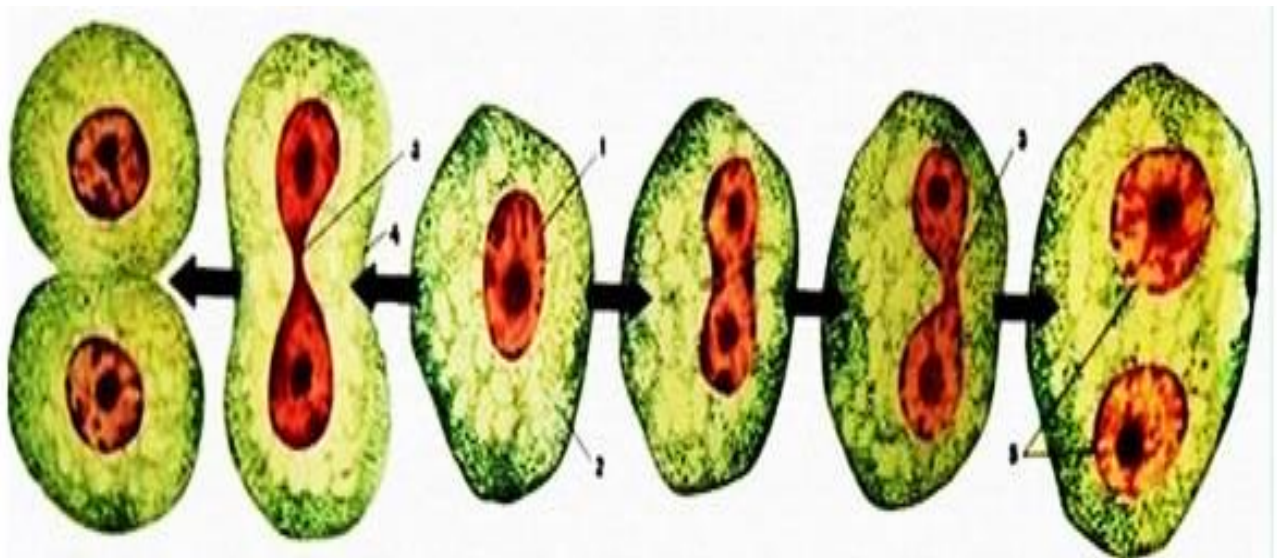


Рис. 45. Митоз

**Эндоми́тоз** — обновление протоплазмы в рамках старой формы; это незаконченный митоз, в результате которого образуется полиплоидная или много-ядерная клетка. Такой способ репродукции характерен для нейронов, гепатоцитов, мегакариоцитов и некоторых других клеток.



Рис. 46. Эндоми́тоз.



*Рис. 47. Амитоз.*



*Рис. 48. Амитоз.*



**Точка рестрикции** – это та точка клеточного цикла, после которой клетка становится невосприимчивой к внешним сигналам вплоть до завершения всего клеточного цикла. Точка рестрикции делит G1 фазу на два функционально различных этапа: G1pm (постмитотический этап) и G1ps (пре-синтетический этап). В течение G1pm клетка оценивает присутствующие в ее окружении ростовые факторы.

Существуют внешние и внутренние факторы, которые либо ускоряют, либо замедляют процессы пролиферации. Внешние факторы – температура, радиация, рентгеновские лучи, ультрафиолетовые лучи и т.д. Например: высокие дозы радиации вызывают аномальные митозы (полицентрический, моноцентрический). Внутренние факторы: 1.изменение ядерно-плазменных отношений вызывает гибель или деление клетки, 2.потеря контактных взаимоотношений между клетками может привести к образованию злокачественной опухоли, 3.изменение позиционной информации.



Рис. 49. Клеточный цикл.

Популяции клеток, полностью потерявшие свойство делиться: клетки, находящиеся на терминальной стадии дифференцировки – зрелые нейроны, зернистые лейкоциты крови, кардиомиоциты. Исключение составляют им-

мунные В- и Т-клетки памяти, которые, находясь в конечной стадии дифференцировки, при появлении в организме определенного стимула в виде ранее встречавшегося антигена, способны начать пролиферировать.

Процесс пролиферации клеток жестко регулируется как самой клеткой (регуляция клеточного цикла, прекращение или замедление синтеза аутокринных ростовых факторов и их рецепторов), так и ее микроокружением (отсутствие стимулирующих контактов с соседними клетками и матриксом, прекращение секреции и/или синтеза паракринных ростовых факторов). Нарушение регуляции пролиферации приводит к неограниченному делению клетки, что в свою очередь инициирует развитие онкологического процесса в организме.

Основную функцию, связанную с инициацией пролиферации, берет на себя плазматическая мембрана клетки. Именно на ее поверхности происходят события, которые связаны с переходом покоящихся клеток в активированное состояние, предшествующее делению. Плазматическая мембрана клеток за счет располагающихся в ней молекул-рецепторов воспринимает различные внеклеточные митогенные сигналы и обеспечивает транспорт в клетку необходимых веществ, принимающих участие в инициации пролиферативного ответа. Митогенными сигналами могут служить контакты между клетками, между клеткой и матриксом, а также взаимодействие клеток с различными соединениями, стимулирующими их вступление в клеточный цикл, которые получили название факторов роста. Клетка, получившая митогенный сигнал на пролиферацию, запускает процесс деления.

**Паранекроз** (около смерти) – это общая неспецифическая реакция, которая возникает в результате старения клетки, или в ответ на воздействие неблагоприятных факторов и приводит к нарушению внутреннего равновесия в клетке:

- 1.подавление способности к гранулообразованию
- 2.понижение дисперсности коллоидной системы
- 3.сдвиг рН в кислую сторону
- 4.потеря возбудимости

В основе паранекроза лежит обратимая денатурация белков. Нарастающее действие повреждающих факторов приводит клетку в состояние дистрофии.

**Дистрофия** – это нарушение обмена веществ в клетки. Она может быть белковой (зернистая или мутная дистрофия), липидной (тигровое сердце, гусиная печень), углеводной, гидропической.

**Два вида дистрофии:** 1.физиологическая (необратимая) дистрофия, всегда приводит к некрозу клетки (пример – эпидермис кожи, волосы, ногти)  
2.патологическая (обратимая) дистрофия.





*Рис. 50. Дистрофия сетчатки. Макулодистрофия.*



*Рис. 51. Дистрофия зубов у больных сахарным диабетом.*

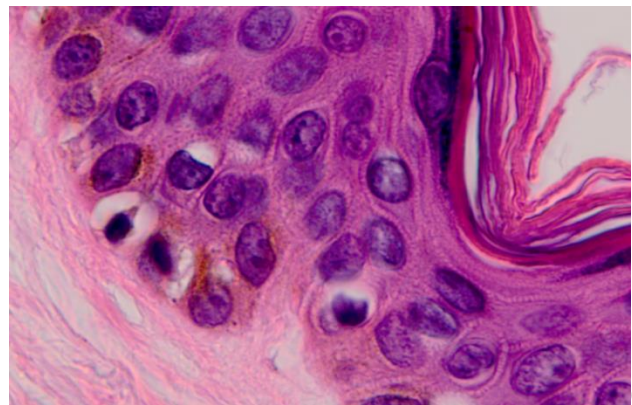
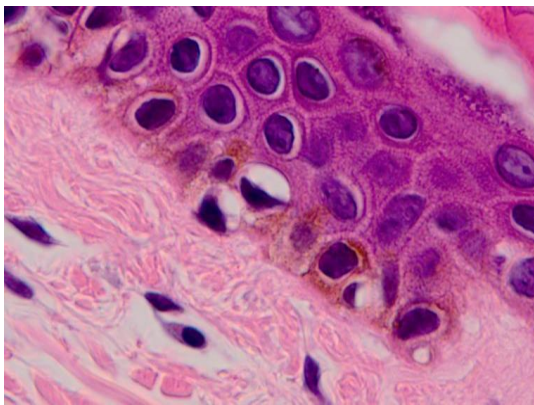


Рис. 52. Апоптоз. Физиологическая необратимая дистрофия в эпидермисе кожи человека. Апоптоз кератиноцитов. Окраска гематоксилин – эозином. Микрофото. Ув. х 600. (Фото Рева Г.В.).

В том случае, когда патологические процессы не затронули ядро клетки и снято неблагоприятное действие раздражителя, клетка может **адаптироваться**:

1. на молекулярном уровне (полиплоидия)
2. на субклеточном (увеличение количества органелл)
3. на клеточном (гипертрофия, гиперплазия)
4. на тканевом (метаплазия)

В настоящее время различают два типа гибели клеток: **некроз** и **апоптоз**. Некроз трактуют как наиболее частую неспецифическую форму гибели клеток. Он может быть вызван тяжелыми повреждениями в результате прямой травмы, радиации, влияния токсических агентов, вследствие гипоксии и т.д.

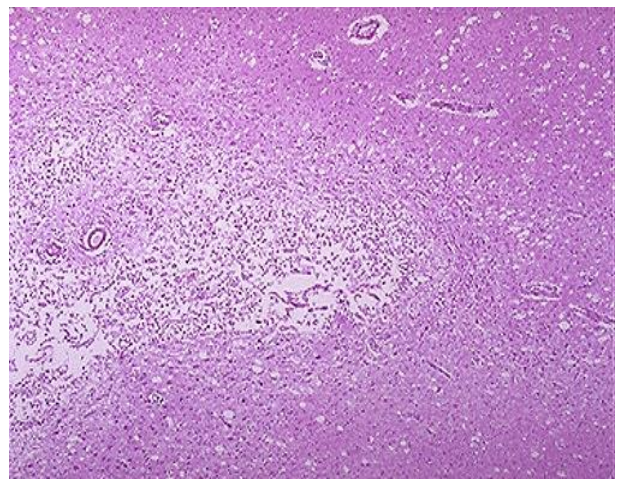
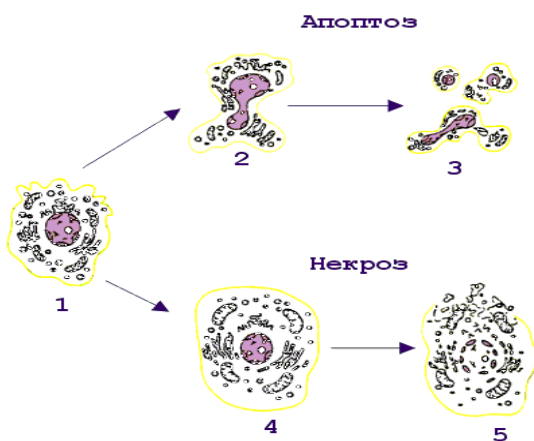


Рис. 53. Некроз. Гистологический препарат. (г/э).

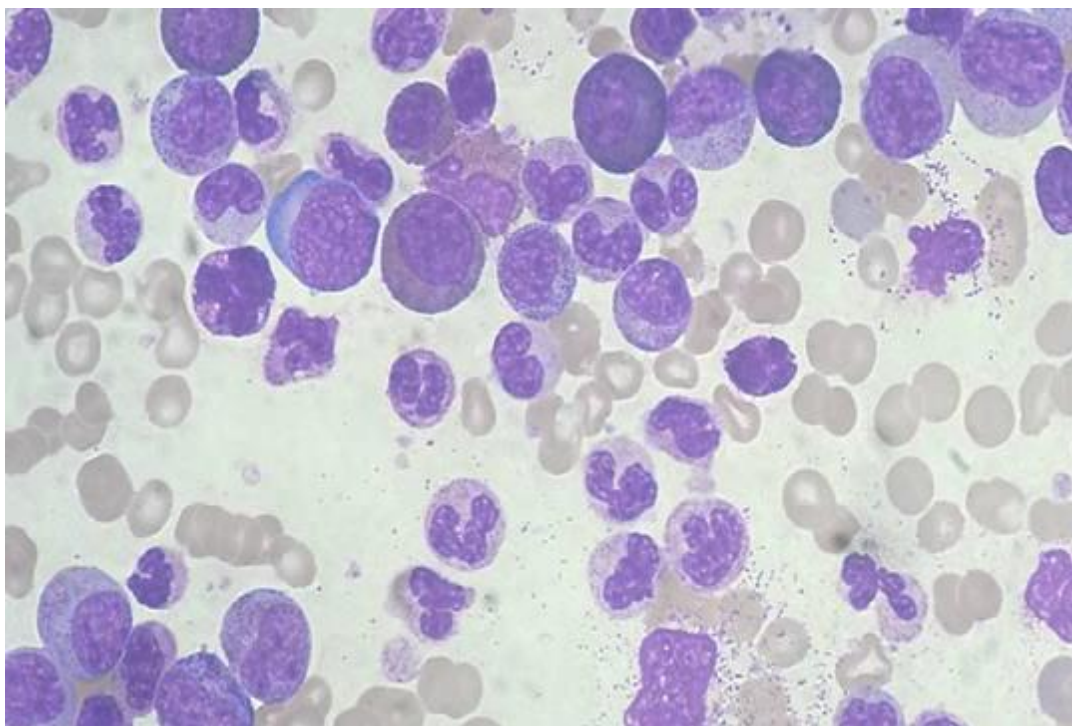


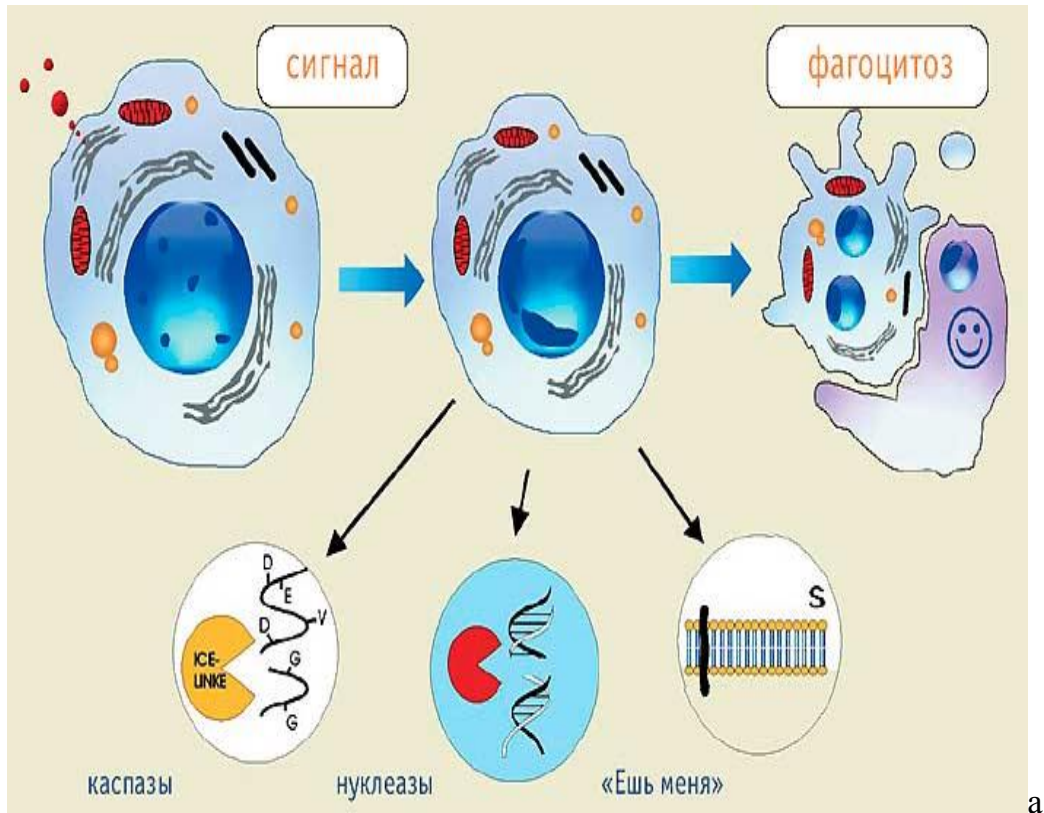
Рис. 54. Кровь человека, больного лейкозом (клетки с фигурами abortивных митозов, амитозов) (фото Рева И.В., Ямамото Т, Рева Г.В.)

В отличие от некроза, апоптоз – это запрограммированная гибель клетки, вызываемая внутренними или внешними сигналами, которые сами по себе не являются токсичными или деструктивными. Апоптоз – это активный процесс, требующий затрат энергии, транскрипции генов и синтеза белка *de novo*. Апоптогенное действие строго специфично в различных типах клеток. Например: В иммунной системе таким действием обладают интерлейкины, которые могут как индуцировать, так и ингибировать апоптоз иммунных клеток. Клетки большинства опухолей обладают пониженной способностью запускать механизмы клеточной гибели в ответ на некоторые физиологические стимулы. Существуют вирусы (герпеса, гриппа, кори, полиомиелита, аденовирусы), которые в клетках-хозяевах способны индуцировать апоптоз. Апоптоз является физиологическим процессом, некроз является патологическим процессом. Но существуют и другие формы программируемой гибели, например, аутофагия – Процесс аутофагии заключается в том, что органеллы соединяются с лизосомами, где перевариваются лизосомальными ферментами. Затем остатки клетки поглощаются макрофаги. Различия и баланс процесса аутофагии с апоптозом. (Приложение 2)

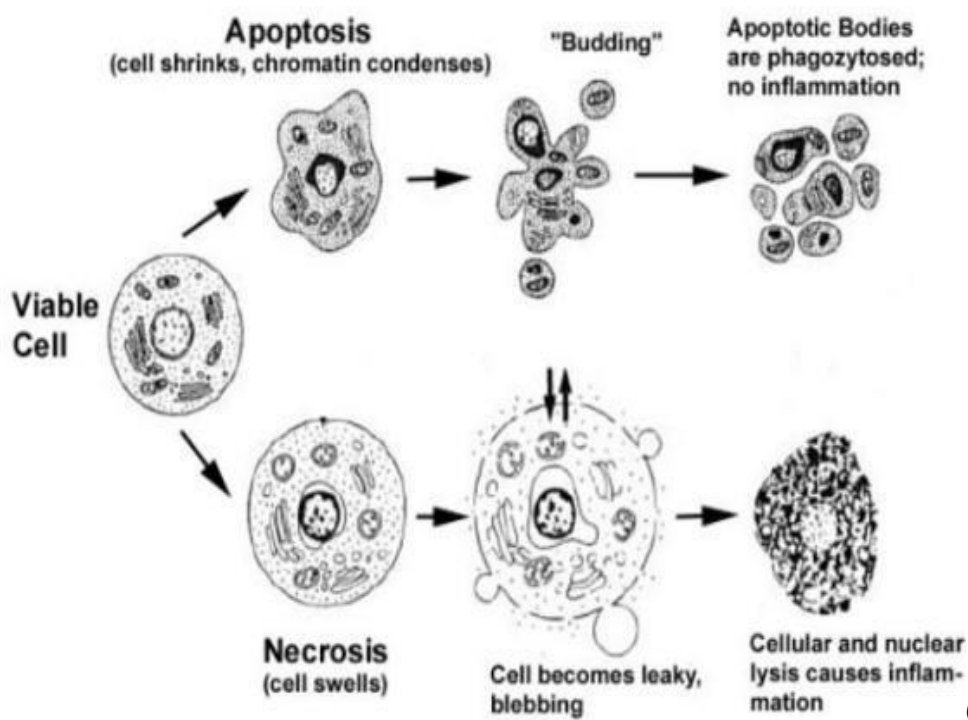
При апоптозе возникают характерные изменения клетки и межклеточного вещества: ядро и цитоплазма сморщиваются, распадаются на глыбки и растворяются, лизируются, что связано с активацией гидролитических ферментов лизосом – рибо- и дезоксирибонуклеаз, кислой фосфатазы и других в результате повышения проницаемости клеточных мембран, концентрации водородных ионов (ацидоза), изменения осмотического равновесия.



Апоптоз является естественным, эволюционно обусловленным и генетически контролируемым механизмом морфогенеза. Наряду с пролиферацией, сортировкой и миграцией клеток, он обеспечивает дифференцировку и специализацию тканей, способствует приобретению характерных для определенного биологического вида черт морфофункциональной организации.



а



б

Рис. 55. Апоптоз.

Апоптоз является общебиологическим механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеток, формообразование, выбраковку дефектных клеток в органах и тканях.

Опытным путем установили, что разрушение клеток имеет три уровня регуляции: генетический контроль, межклеточные взаимодействия и организменный.

Наилучшим образом генетический контроль апоптоза иллюстрирует недавно открытый ген p53. Белок, контролируемый этим геном, обладает способностью при определенных условиях блокировать клеточное деление, митоз, и запускать механизмы апоптоза. Вызванная повреждением ДНК остановка клеточного цикла в сочетании с невозможностью молекулярной репарации (восстановления) измененного наследственного материала может с участием белка, синтез которого контролирует ген p53, приводить к активации процесса самоликвидации, апоптоза дефектной клетки. Мутации и дефекты этого гена или регулирующих его активность нуклеотидных фрагментов ДНК встречаются в опухолевых клетках и обнаружены у 55–70% раковых больных.

Механизмы апоптоза сложны и многообразны, представляют собой самый сложный молекулярный каскад, изучением которого занимаются многие и многие лаборатории по всему миру. Несомненная важность этих исследований в аспекте онкологии и геронтологии доказана успехами терапии онкологических заболеваний индукторами апоптоза раковых клеток.

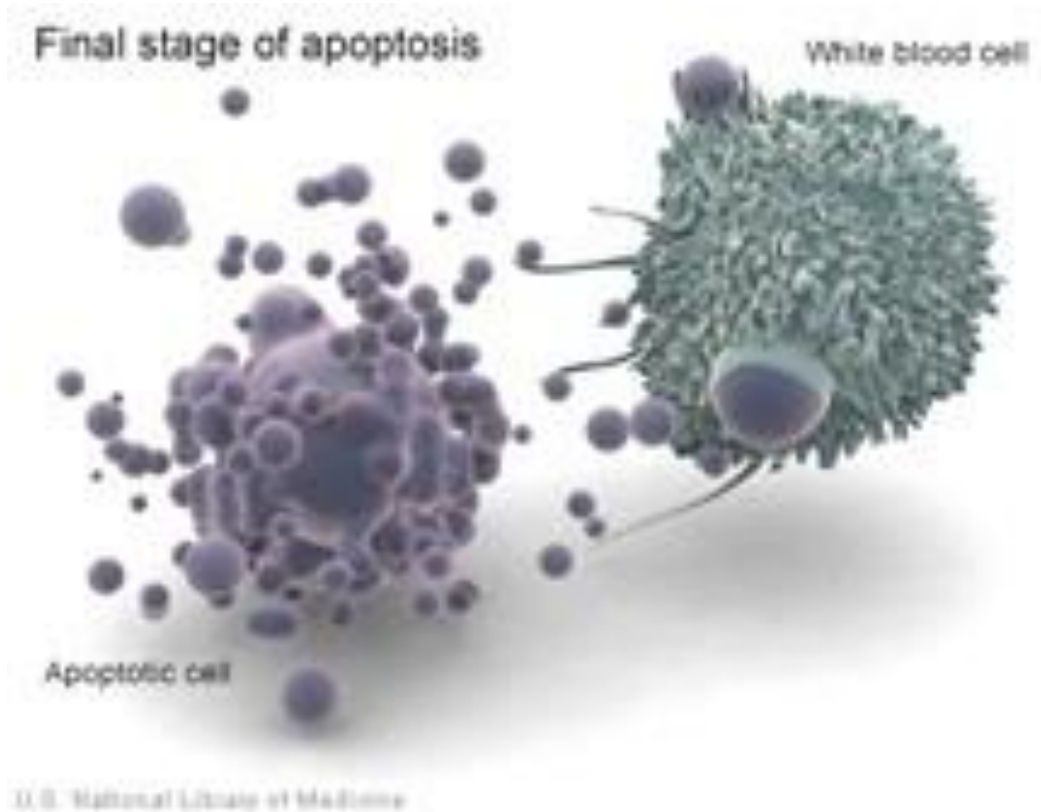


Рис. 56. Финальная стадия апоптоза.



В механизмах апоптоза выделяется два этапа смертельный приказ, активация генов.

Начнем с первого этапа: смертельный приказ. С того, что клетка получает "приказ умереть", ее гибель необходима для дальнейшей жизнедеятельности организма.

Это происходит с помощью сигналов из внеклеточной среды, которые клетка воспринимает с помощью своего рецепторного аппарата. Иногда сигналом для начала апоптоза может быть и отсутствие необходимого сигнала.

В результате контакта сигнальных молекул с наружной частью белка-рецептора этот рецептор претерпевает структурные изменения. Структурная перестройка захватывает и внутриклеточную часть молекулы рецептора. Она может либо обладать определенной ферментативной активностью сама, либо быть тесно связана с некоторыми клеточными ферментами.

Изменение активности рецепторной молекулы приводит к активации фермента. Часто речь идет об изменении концентрации ионов кальция, а также некоторых относительно мелких фосфорсодержащих органических соединений относящихся к классу нуклеотидов.

Активные соединения появляются и в результате гидролиза определенных липидов клеточной мембраны. В свою очередь, все это ведет к присоединению или отсоединению остатков фосфата от молекул белковых регуляторов (фосфорилирование), способных влиять на генетический аппарат клетки. Фосфорилирование и дефосфорилирование (отщепление остатка фосфорной кислоты), а также некоторые другие биохимические модификации меняют активность этих регуляторов.

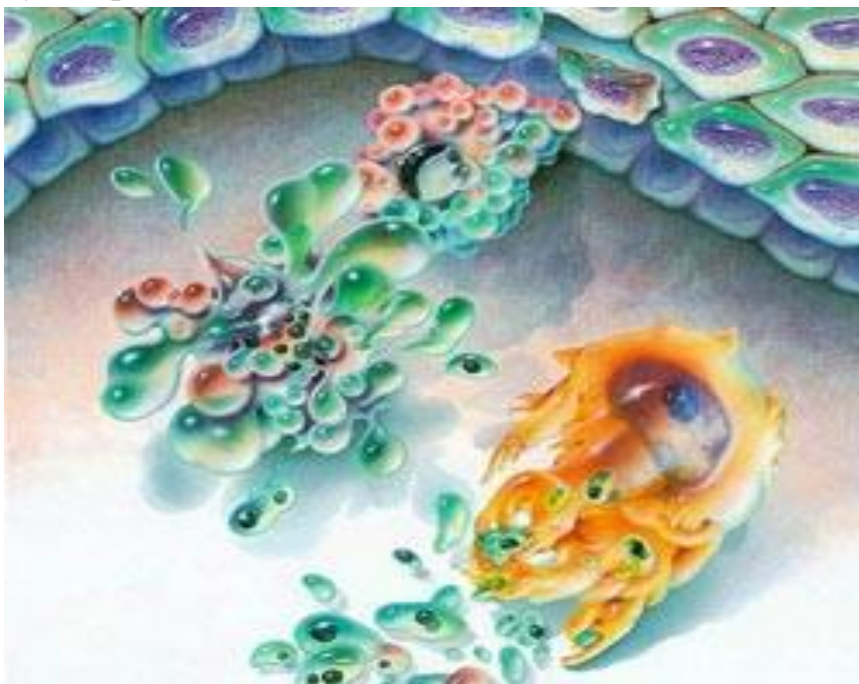


Рис. 57. Рецепторы клетки.

Можно выделить рецепторы, которые воспринимают летальный сигнал.

Известны два структурно гомологичных рецептора TNF, p55 и p75 (TNF-RI, TNF-RII, соответственно), относящиеся к трансмембранным белкам I типа. Кроме этого задействованы "рецепторы смерти" CD95. Рецепторы CD 95 и рецепторы TNF принадлежат к растущему суперсемейству рецепторов, имеющих гомологию в экстраклеточных доменах. Семейство включает в себя также рецептор факторы роста нервов, В-клеточный антиген CD40, маркер активации Т-лимфоцитов CD27 и некоторые гомологичные белки млекопитающих и вирусов.

CD95 и TNF-R1 имеют дополнительную гомологичную последовательность во внутриклеточной части молекул. Этот трандукции цитотоксического (повреждающего клетку) сигнала. Цитоплазматический С-конец CD95 содержит также "домен спасения", удаление которого усиливает цитотоксическую активность рецептора.

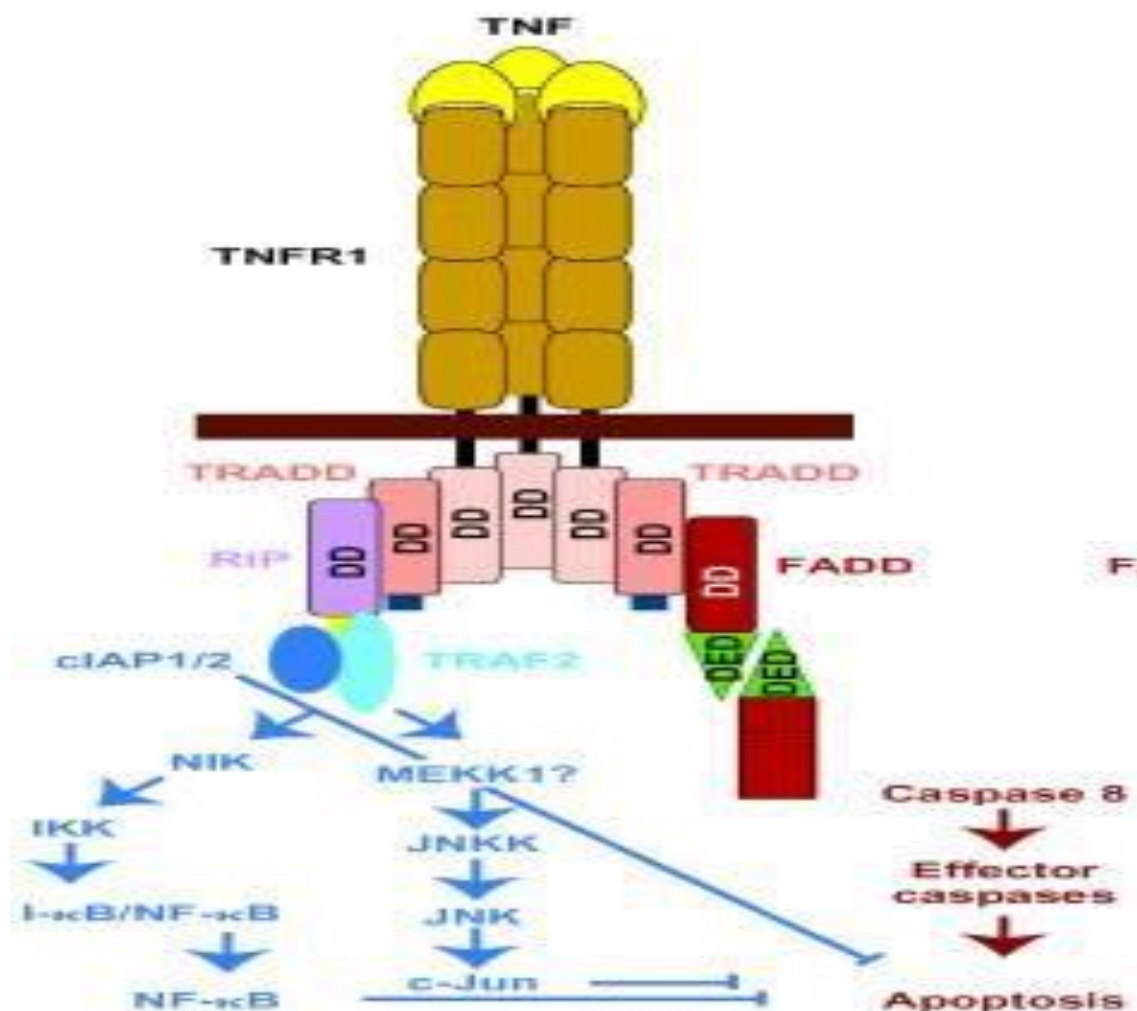


Рис. 58. Трансдукция повреждающего сигнала.

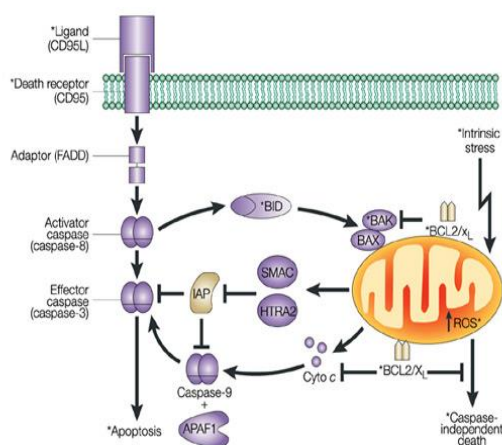
TNF и лиганд CD95 (CD95-L) являются трансмембранными белками второго типа с внеклеточным С-концевым, внутриклеточным N-концевым и одним

трансмембранным элементами, но они могут функционировать и в растворимой, "слущенной" с мембраны форме. И CD95-L, и TNF связываются с соответствующим рецепторами в виде тримера, "сшивают" 3 молекулы рецептора, что активирует его для передачи проапоптотического сигнала.

Интенсивные исследования сигнальных механизмов апоптоза, индуцированного антителами к CD95/CD95-L и TNF, привели к значительному прогрессу в двух направлениях – идентификация белков, взаимодействующих с CD95 и TNF-R1, и выяснение участия в процессе вторичного мессенджера церамида

"Домен смерти" TNF-R1 взаимодействует также с серин/треониновой протеинкиназой и фосфорилируется этим ферментом. 30 С-концевых аминокислотных остатков ингибируют связывание рецептора с протеинкиназой. Роль этих событий в передаче цитотоксического сигнала неясна. Недавно описана тирозиновая фосфатаза, FAP-1, взаимодействующая с 15 С-концевыми аминокислотами CD95, "доменом спасения". Гиперэкспрессия FAP-1 подавляет апоптоз, опосредованный CD95.

Описанные белки участвуют, по-видимому, в начальных этапах передачи сигнала. Другая группа данных свидетельствует о том, что и CD95-L или антитела к CD95, и TNF активируют сфингомиленовый путь передачи. Поздние этапы клеточной гибели, индуцированной через CD95 и TNF-R1, таковы же, как при классическом апоптозе. Гибель клеток может быть предотвращена *ctmA*, что указывает на участие ICE-подобных протеаз. Bcl-2 подавляет апоптоз, индуцированный через CD95 и TNF-R1, по крайней мере на некоторых клеточных линиях.



Nature Reviews | Drug Discovery

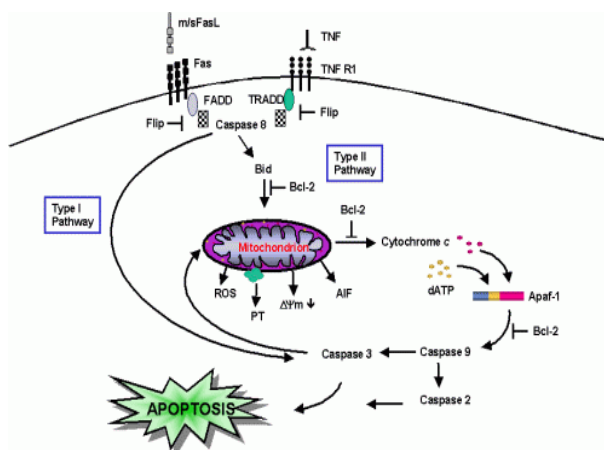


Рис. 59. Участие FAS (CD95) в апоптозе.

Этот путь передачи летального сигнала схематически можно изобразить следующим образом: индукторы – рецепторы – адаптеры -каспазы первого эшелона -регуляторы -каспазы второго эшелона. Так, рецептор, обозначаемый Fas, взаимодействуя с соответствующим лигандом (лигандом FasL), трансмембранным белком Т-киллера, активируется и запускает программу смерти клетки, инфицированной вирусом. Тем же путем при взаимодействии с лигандом FasL на поверхности Th1-лимфоцитов или с антителом к Fas-рецептору погибают ставшие ненужными выздоровевшему организму В-лимфоциты, продуценты антител, несущие Fas-рецептор. FasL– лиганд, относящийся к многочисленному семейству фактора некроза опухолей TNF. Это семейство гомотримерных лигандов (т.е. биологически активных веществ (белков), состоящих из 3 одинаковых доменов (частей), кроме FasL и TNFa , включает TNFb (лимфотоксин).Fas – член семейства рецепторов TNF. Как говорилось выше, все они представлены трансмембранными белками, которые внеклеточными участками взаимодействуют с тримерами лигандов-индукторов . Взаимодействие рецептора и лиганда приводит к образованию кластеров рецепторных молекул и связыванию их внутриклеточных участков с адаптерами. Адаптер, связавшись с рецептором, вступает во взаимодействие с эффекторами, пока еще неактивными предшественниками протеаз из семейства каспаз первого эшелона (иницирующих каспаз).

Взаимодействие адаптера с рецептором и эффектором осуществляется через гомофильные белок-белковые взаимодействия небольших доменов: DD (death domain – домен смерти),DED(death-effector domain – домен эффектора смерти),CARD (– домен активации и рекрутирования каспазы). Все они имеют сходную структуру, содержат по шесть  $\alpha$ -спиральных участков. Домены DD(домен смерти) участвуют во взаимодействии рецептора Fas с адаптером FADD (Fas-associated DD-protein). Домены DED участвуют во взаимодействии адаптера FADD с прокаспазами 8 и 10.

Наиболее подробно охарактеризована прокаспаса-8, рекрутируемая рецептором Fas через адаптер FADD. Образуются агрегаты FasL – Fas – FADD – прокаспаса-8. Подобные агрегаты, в которых происходит активация каспаз, названы *апоптосомами*, *апоптозными шаперонами* , или *сигнальными комплексами, индуцирующими смерть*.

Прокаспазы обладают незначительной протеолитической активностью, составляющей 1–2% активности зрелой каспазы. Будучи в мономерной форме, прокаспазы, концентрация которых в клетке ничтожна, находятся в латентном состоянии. Предполагается, что пространственное сближение молекул прокаспаз при их агрегации ведет к образованию активных каспаз через механизм протеолитического само- и перекрестного расщепления (ауто- или транс-

процессинга)]. В результате от прокаспазы (молекулярная масса 30–50 кДа) отделяется регуляторный N-концевой домен (продомен), а оставшаяся часть молекулы разделяется на большую (~20 кДа) и малую (~10 кДа) субъединицы (рис. 3). Затем происходит ассоциация большой и малой субъединиц. Два гетеродимера образуют тетрамер с двумя каталитическими участками, действующими независимо друг от друга. Таким образом прокаспазы-8 активируются и высвобождаются в цитоплазму в виде каспазы-8. Существуют другие пути активации каспазы-8 – с участием рецепторов TNFR1 и DR3.

На этапе активации каспаз первого эшелона жизнь клетки еще можно сохранить. Существуют регуляторы, которые блокируют или, напротив, усиливают разрушительное действие каспаз первого эшелона. К ним относятся белки Bcl-2 (ингибиторы апоптоза: A1, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-XL, Bcl-1, Mcl-1 и NR13) и Bax (промоторы апоптоза: Bad, Bak, Bax, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim, Hrk, Mtd). Эти белки эволюционно консервативны: гомолог Bcl-2 обнаружен даже у губок, у которых апоптоз необходим для морфогенеза

Каспаза-8 активирует каспазу второго эшелона (эффекторную каспазу): путем протеолиза из прокаспазы-3 образуется каспаза-3, после чего процесс, запущенный программой смерти, оказывается необратимым.

Каспаза-3 способна в дальнейшем к самостоятельной активации (автокатализу или автопроцессингу), активирует ряд других протеаз семейства каспаз, активирует фактор фрагментации ДНК, ведет к необратимому распаду ДНК на нуклеосомальные фрагменты. Так запускается каскад протеолитических ферментов, осуществляющих апоптоз.

Каспазы-семейство эволюционно консервативных сериновых протеаз, которые специфически расщепляют белки после остатков аспарагиновой кислоты.

На основе структурной гомологии каспазы подразделяются на подсемейства – каспазы-1 (каспазы 1, 4, 5) – каспазы-2 (каспазы-2) и – каспазы-3 (каспазы 3, 6–10) .

Цистеиновые протеазы, по-видимому, участвуют также в запрограммированной клеточной гибели у растений . Однако апоптоз возможен и без участия каспаз: сверхсинтез белков-промоторов апоптоза BAX и BAK индуцирует гибель в присутствии ингибиторов каспаз.

В результате действия каспаз происходит:

1. Активация прокаспаз с образованием каспаз;
2. Расщепление антиапоптозных белков семейства Bcl-2. Подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственный за фрагментацию ДНК. В нормальных клетках апоптозная ДНКаза CAD (caspase-activated DNase) образует неактивный комплекс с ингибитором CAD, обозначаемым ICAD или . При апоптозе ингибитор ICAD с участием каспаз 3 или 7 инактивируется , и сво-



бодная CAD, вызывая межнуклеосомальные разрывы хроматина, ведет к образованию фрагментов ДНК с молекулярной массой, кратной молекулярной массе ДНК в нуклеосомных частицах– 180-200 пар нуклеотидов.

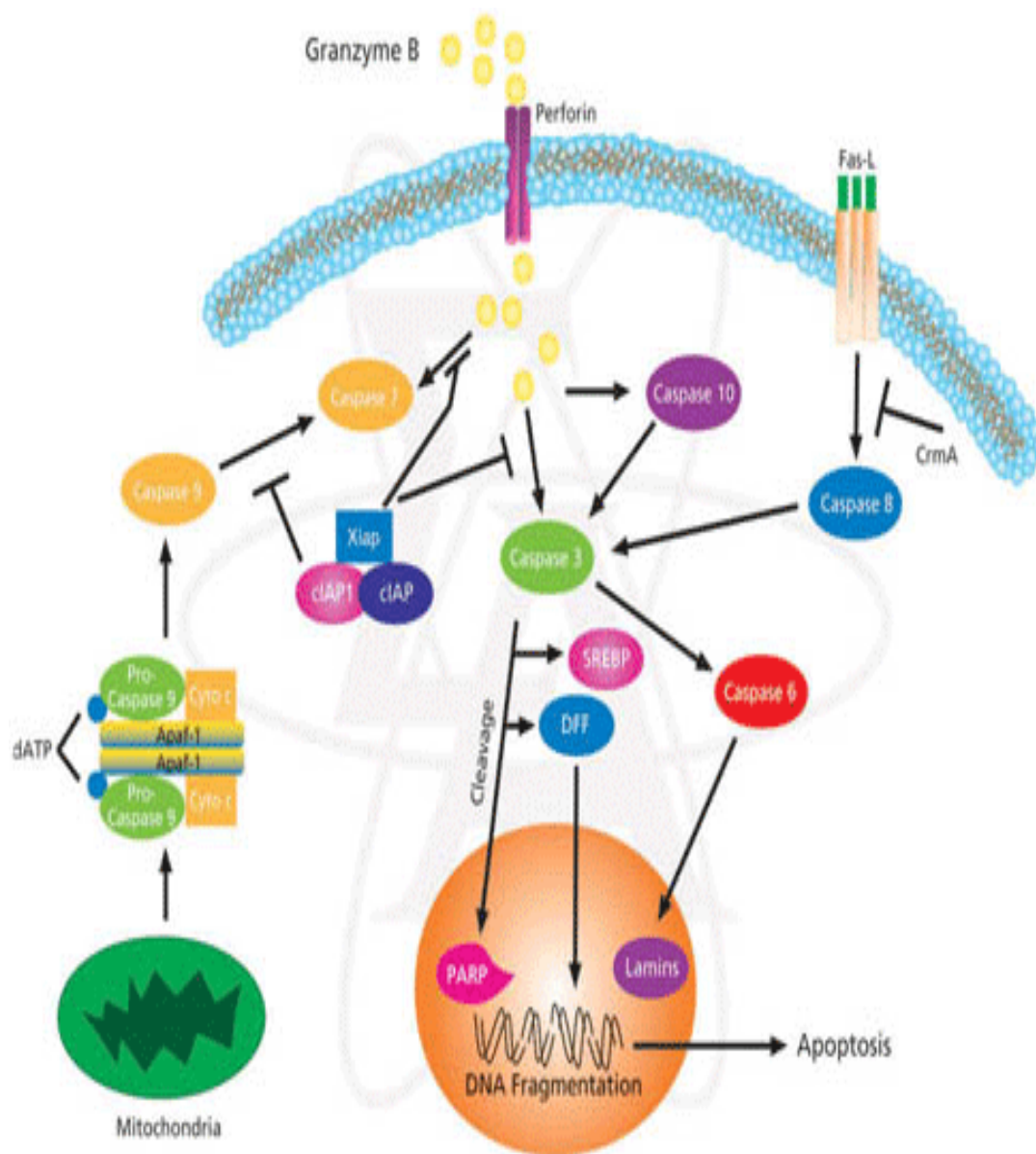


Рис. 60. Участие каспаз в апоптозе

Апоптоз возможен и без фрагментации ДНК . Обнаружен ядерный белок Acinus (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus), из которого при комбинированном действии каспазы-3 (протеолиз при Asp 1093) и неидентифицированной протеазы (протеолиз при Ser 987) образуется фрагмент Ser 987 – Asp 1093. Этот фрагмент в присутствии дополнительных неядерных факторов вызывает апоптотическую конденсацию хроматина и фрагментацию ядра (кариорексис) без фрагментации ДНК ;

3. Гидролиз белков ламинов, армирующих (укрепляющих) ядерную мембрану. Это ведет к конденсации хроматина;

4. Разрушение белков, участвующих в регуляции цитоскелета;
5. Инактивация и нарушение регуляции белков, участвующих в репарации ДНК, сплайсинге мРНК, репликации ДНК.

Мишенью каспаз является поли(ADP-рибозо)полимераза (PARP). Этот фермент участвует в репарации ДНК, катализируя поли(ADP-рибозилирование) белков, связанных с ДНК. Донором ADP-рибозы является  $\text{NAD}^+$ . Активность PARP возрастает в 500 раз и более при связывании с участками разрыва ДНК. Апоптотическая гибель клетки сопровождается расщеплением PARP каспазами. Чрезмерная активация PARP при массивных разрывах ДНК, сильно снижая содержание внутриклеточного  $\text{NAD}^+$ , ведет к подавлению гликолиза и митохондриального дыхания и вызывает гибель клетки по варианту некроза.

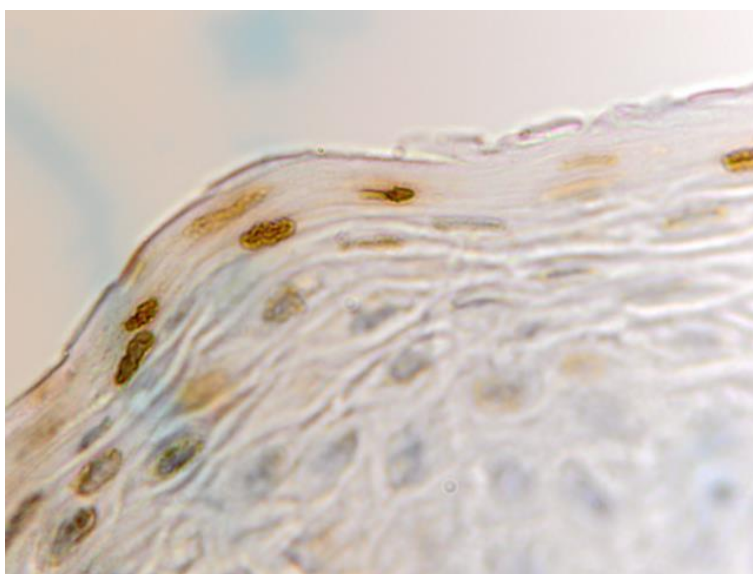


Рис. 61. Апоптоз кератиноцитов в слизистой оболочке рта человека.  
(Фото Рева Г.В., Рева И.В., Толмачева В.Е.).

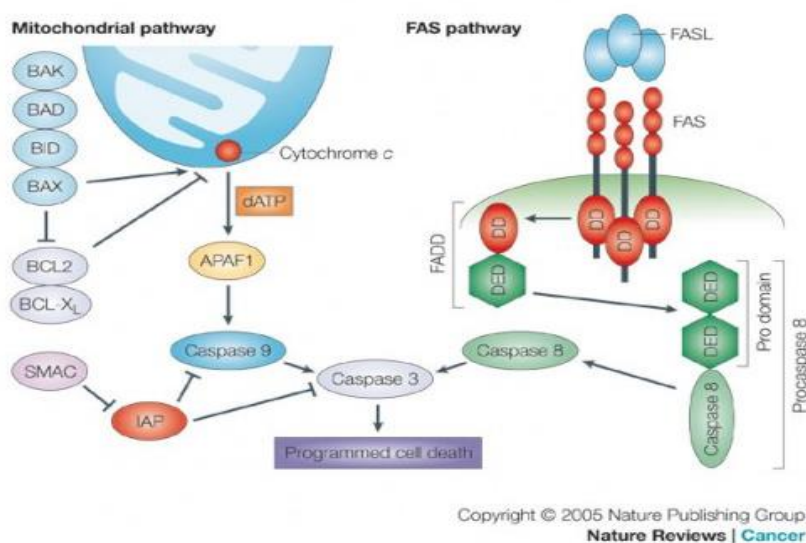


Рис. 62. Митохондриальный путь апоптоза

В клетках, подвергшихся воздействию индуктора апоптоза, резко снижается мембранный потенциал ( $\Delta\psi$ ) митохондрий. Падение  $\Delta\psi$  обусловлено увеличением проницаемости внутренней мембраны митохондрий вследствие образования гигантских пор. Разнообразны факторы, вызывающие раскрытие пор. К ним относятся истощение клеток восстановленным глутатионом, NAD(P)H, АТФ и АДФ, образование активных форм кислорода, разобщение окислительного фосфорилирования протонотрассными соединениями, увеличение содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме. Образование пор в митохондриях можно вызвать церамидом, NO, каспазами, амфипатическими пептидами, жирными кислотами. Поры имеют диаметр 2,9 нм, позволяющий пересекать мембрану веществам с молекулярной массой 1,5 кДа и ниже. Следствием раскрытия поры является набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной мембраны митохондрий и высвобождение растворимых белков межмембранного объема. Среди этих белков – ряд апоптогенных факторов: цитохром С, прокаспазы 2, 3 и 9, белок AIF (apoptosis inducing factor), представляющий собой флавопротеин с молекулярной массой 57 кДа.

Образование гигантских пор не является единственным механизмом выхода межмембранных белков митохондрий в цитоплазму. Предполагается, что разрыв наружной мембраны митохондрий может быть вызван гиперполяризацией (переход заряда в отрицательную область) внутренней мембраны. Возможен и альтернативный механизм, без разрыва мембраны, – раскрытие гигантского белкового канала в самой наружной мембране, способного пропускать цитохром С и другие белки из межмембранного пространства.

Высвобождаемый из митохондрий цитохром с вместе с цитоплазматическим фактором APAF-1 (apoptosis protease activating factor-1) участвует в активации каспазы-9.

APAF-1 – белок с молекулярной массой 130 кДа, содержащий CARD-домен (caspase activation and recruitment domain) образует комплекс с прокаспазой-9 в присутствии цитохрома с и dATP или АТФ. Из этих субъединиц собираются жесткие, симметричные структуры, наподобие веера или пропеллера. APAF-1 играет роль арматуры, на которой происходит аутокаталитический процессинг каспазы-9. Предполагается, что в результате зависящего от гидролиза dATP (или АТФ) конформационного изменения APAF-1 приобретает способность связывать цитохром С. Связав цитохром с, APAF-1 претерпевает дальнейшее конформационное изменение, способствующее его олигомеризации и открывающее доступ CARD-домена APAF-1 для прокаспазы-9, которая тоже содержит CARD-домен. Так образуется конструкция, называемая тоже апоптосомой, с молекулярной массой  $> 1,3$  млн дальтон, в составе которой – не менее 8 субъединиц APAF-1. Благодаря гомофильному CARD-CARD-

взаимодействию с АРАФ-1 в эквимольном соотношении связывается про-каспаза-9, а затем прокаспаза-9 связывает прокаспазу-3. Пространственное сближение молекул прокаспазы-9 на мультимерной арматуре из АРАФ-1-цитохром-с-комплексов, по-видимому, приводит к межмолекулярному протеолитическому процессингу (модификации) прокаспазы-9 с образованием активной каспазы-9. Зрелая каспаза-9 затем расщепляет и активирует прокаспазу-3.

Флавопротеин АІF, будучи добавленным к изолированным ядрам из клеток HeLa, вызывает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК, а при добавлении к изолированным митохондриям печени крыс – высвобождение цитохрома с и каспазы- АІF является митохондриальным эффектором гибели клеток у животных, действующим независимо от каспаз .

Кроме рассмотренных компонентов, при нарушении наружной мембраны митохондрий из межмембранного объема выделяется термолабильный фактор, вызывающий необратимое превращение ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу . Ксантиндегидрогеназа катализирует зависимое от NAD<sup>+</sup> окисление ксантина до гипоксантина и последующее окисление гипоксантина до мочевой кислоты. Ксантиноксидаза катализирует те же реакции, но не с NAD<sup>+</sup>, а с O<sub>2</sub> в качестве акцептора электронов. При этом образуются O<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а из них – и другие активные формы кислорода (АФК), которые разрушают митохондрии и являются мощными индукторами апоптоза. Механизмы образования АФК, конечно, не ограничиваются ксантиноксидазной реакцией. Главным источником АФК в клетках являются митохондрии. Резкое увеличение АФК происходит при возрастании мембранного потенциала в митохондриях, когда снижено потребление АТФ и скорость дыхания лимитируется ADP . Цитоплазматическая мембрана макрофагов и нейтрофилов содержит O<sub>2</sub>A – генерирующую NADPH-оксидазу.

В зависимости от пути, по которому осуществляется активация каспаз, различают разные типы клеток. Клетки типа I (в частности, линия лимфобластоидных В-клеток SKW и Т-клетки линии Н9) подвергаются ПКС по пути, зависимому от апоптозных рецепторов плазматической мембраны без участия митохондриальных белков. Клетки типа II (например, линии Т-клеток Jurkat и СЕМ) погибают по пути апоптоза, зависимому от митохондриального цитохрома С. Гибель клеток, вызванная химиотерапевтическими соединениями, УФ- или i-облучением, по-видимому, напрямую связана с апоптозной функцией митохондрий.

Некоторые клетки, например, клетки эмбриональной нервной системы, включают механизмы апоптоза, если они испытывают дефицит апоптозподавляющих сигналов (называемых также факторами выживания) от других клеток. Физиологический смысл процесса – в элиминации избыточных нервных клеток,

конкурирующих за ограниченный фонд факторов выживания. Эпителиальные клетки при отделении от внеклеточного матрикса, вырабатывающего факторы выживания, тоже обречены на смерть. Факторы выживания связываются соответствующими цитоплазматическими рецепторами, активируя синтез подавляющих апоптоз агентов и блокируя стимуляторы апоптоза. Некоторые вещества (например, стероидные гормоны) оказывают дифференцированный эффект на различные типы клеток – предотвращают апоптоз одних типов клеток и индуцируют его у других. Так, при наличии во внеклеточном матриксе факторов роста PDGF (platelet-derived growth factor – тромбоцитарный фактор роста) или NGF (nerve growth factor – фактор роста нервов) и цитокина интерлейкина-3 (IL-3) проапоптозный белок Bad не активен. Факторы роста, связавшись со своим рецептором на плазматической мембране, вызывают активацию цитозольной протеинкиназы B, и катализирующей фосфорилирование Bad по Ser-136. IL-3 тоже связывается со своим рецептором на плазматической мембране и активирует митохондриальную cAMP-зависимую протеинкиназу A, катализирующую фосфорилирование Bad по Ser-112. Будучи фосфорилированным по обоим остаткам серина, Bad образует комплекс с белком 14-3-3, располагающийся в цитоплазме. Дефицит факторов роста и IL-3 воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу: происходит дефосфорилирование Bad, его внедрение в наружную мембрану митохондрий, выход цитохрома c из митохондрий и последующая активация каспазы-9 через АРАF-1-зависимый механизм.

Существуют другие пути апоптоза. В ряде случаев апоптоз реализуется в результате комбинированного действия двух путей – с участием и рецепторов плазматической мембраны, и митохондриального цитохрома C. Так, повреждение ДНК ведет к накоплению в клетке белкового продукта гена p53, который может останавливать деление клеток и/или индуцировать апоптоз.

Белок p53 является фактором транскрипции, регулирующим активность ряда генов. Предполагается, что ответная реакция на образование белка p53 зависит от степени нарушения клеточного генома. При умеренном нарушении генома происходит остановка клеточного деления, осуществляется репарация ДНК, и клетка продолжает свое существование. При чрезмерном нарушении генома, когда ДНК уже не поддается репарации, включаются рецепторный и цитохром C-зависимый апоптозные каскады активации каспаз.

Также Существует путь передачи летального сигнала с участием эндоплазматического ретикулума (ЭР). В ЭР локализована прокаспаза-12. Нарушение внутриклеточного  $Ca^{2+}$ -гомеостаза добавкой тапсигаргина или  $Ca^{2+}$ -ионофорного антибиотика А23187 ведет к апоптозу клеток, вызванному превращением прокаспазы-12 в каспазу-12. ЭР-зависимый апоптоз связан с болезнью Альцгеймера.



Цитотоксические лимфоциты, Т-киллеры, могут вызывать апоптоз у инфицированных клеток с помощью белка перфорины. Полимеризуясь, перфорин образует в цитоплазматической мембране клетки-мишени трансмембранные каналы, по которым внутрь клетки поступают TNF $\beta$ , гранзимы(фрагментины) – смесь сериновых протеаз. Существенным компонентом этой смеси является гранзим В – протеолитический фермент, превращающий прокаспазу-3 в активную каспазу-3.

Взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом осуществляется с помощью интегринов. Интегрины – большое семейство гетеродимерных мембранных белков, которые участвуют в адгезии клеток, связывая внутриклеточный цитоскелет с лигандами внеклеточного матрикса. Нарушение адгезии клеток индуцирует апоптоз. Особую форму апоптоза претерпевают эритроциты млекопитающих. Биогенез эритроцитов из плюрипотентной стволовой клетки в костном мозге включает ряд промежуточных этапов. На этапе эритроблеста ядро изгоняется (выталкивается) из клетки и пожирается макрофагом. Альтернативный вариант: кариорексис (деструкция ядра) с образованием телец Жолли (остатки хроматина) и их последующий распад и лизис внутри клетки. Безъядерная клетка, называемая ретикулоцитом, в дальнейшем теряет митохондрии и рибосомы и превращается в эритроцит. Потерю ядра эритробластом можно рассматривать как особую форму ядерного апоптоза. Выяснение его механизма позволило бы применить его для обезвреживания опухолевых клеток.

На втором этапе запрограммированной смерти клеток внутриклеточные регуляторы, получив важные инструкции, вносят поправки в работу отдельных генов. Работа эта, как известно, заключается в образовании РНК, а затем и белков. Таким образом, в результате срабатывания генетической программы, первоначально запущенной сигналом с рецептора, происходит изменение набора внутриклеточных РНК и белков. В конечном счете появляются или активируются ферменты – протеазы и нуклеазы.

Ферменты расщепляют содержимое клетки, которое затем поглощается фагоцитами

В регенерации различают такие понятия, как форма регенерации, уровень регенерации, способ регенерации.

Формы регенерации:

1. Физиологическая регенерация – восстановление клеток ткани после их естественной гибели (например, кроветворение);
2. Репаративная регенерация – восстановление тканей и органов после их повреждения (травмы, воспаления, хирургического воздействия и так далее).

Уровни регенерации соответствуют уровням организации живой материи:

1. Клеточный (внутриклеточный);
2. Тканевой;
3. Органный.

Способы регенерации:

1. Клеточный способ (размножением (пролиферацией) клеток);
2. Внутриклеточный способ (внутриклеточное восстановление органелл, гипертрофия, полиплоидия);
3. Заместительный способ (замещение дефекта ткани или органа соединительной тканью, обычно с образованием рубца, например: образование рубцов в миокарде после инфаркта миокарда).

Факторы, регулирующие регенерацию:

1. Гормоны – биологически активные вещества;
2. Медиаторы – индикаторы метаболических процессов;
3. Кейлоны – это вещества гликопротеидной природы, которые синтезируются соматическими клетками, основная функция – торможение клеточного созревания;
4. Антагонисты кейлонов – факторы роста;
5. Микроокружение любой клетки.

#### РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ

Регенерация тканей происходит вследствие пролиферации недифференцированных клеток, обладающих способностью не только делиться под действием соответствующих стимулов, но также и дифференцироваться в клетки той ткани, регенерация которой происходит. Эти клетки носят название взрослых стволовых клеток. Многие ткани взрослого организма, такие как ткани гемopoэтической системы, пищеварительный эпителий, мозг, эпидермис, легкие содержат пул таких клеток. Стволовые клетки тканей взрослого индивидуума снабжают организм зрелыми дифференцированными клетками в течение нормального гомеостаза, а также во время регенерации и восстановления тканей и органов. Две уникальные особенности характеризуют взрослые стволовые клетки: способность генерировать новые плюрипотентные стволовые клетки (т.е. способность самообновляться) и способность давать дифференцированное потомство, которое утрачивает способность к самообновлению.

Наши знания о механизмах, которые определяют когда, где и почему стволовые клетки будут самообновляться или дифференцироваться, остаются весьма ограниченными, но, тем не менее, недавно было показано, что микроокружение (или ниша) стволовых клеток обеспечивает необходимые сигналы для дальнейшего поведения этих клеток. Более того, утрата контроля над поведением этих клеток может приводить к трансформации клеток и раку. Дифференцированные клетки наряду с выполнением своих специфических функций

способны синтезировать особые вещества – кейлоны, тормозящие интенсивность размножения клеток-предшественников и стволовых клеток. Если в силу каких-либо причин количество дифференцированных функционирующих клеток уменьшается (например, после травмы), тормозящее действие кейлонов ослабевает и численность популяции восстанавливается. Кроме кейлонов (местных регуляторов), клеточное размножение контролируется гормонами; одновременно продукты жизнедеятельности клеток регулируют активность желез внутренней секреции. Если какие-либо клетки под воздействием внешних повреждающих факторов претерпевают мутации, они элиминируются из тканевой системы вследствие иммунологических реакций. Исследования в области изучения механизмов контроля клеточного цикла и регуляции репарации ДНК широко ведутся во всем мире. Эта тематика является актуальной уже многие десятилетия, поскольку с нарушениями процессов деления клеток связаны многие заболевания, в частности онкологические болезни. Кроме того, процесс старения организма прежде всего связан с процессами старения клеток (это и неспособность клеток к самовоспроизведению и регенерации, неспособность к сохранению и восстановлению в случае "поломок" наследственной информации).

Огромную роль в изучении механизмов регуляции клеточного цикла сыграл британский ученый Paul Maxime Nurse. Р. Nurse вместе с Leland H. Harwell и R. Timothy Hunt в 2001г. получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за открытие механизмов регуляции клеточного цикла циклинами и циклин-зависимыми киназами. Р. Nurse имеет огромное количество публикаций по тематике регуляции работы отдельных клеток и организма в целом.

Известным ученым в области изучения клеточного цикла и репарации ДНК является профессор Гарвардского университета, генетик, Stephen J. Elledge. S. Elledge изучает регуляцию клеточного цикла и клеточные ответы на повреждения ДНК. Elledge, вслед за нобелевским лауреатом Paul Nurse, открывшим ключевой ген клеточного цикла Cdc2 у грибов, обнаружил гомологичный ген в клетках млекопитающих. Таким образом, ему удалось открыть регуляторные механизмы, лежащие в основе перехода из G1 в S фазу клеточного цикла, и, кроме того, выявить ошибки, происходящие на этом этапе, которые приводят к злокачественной трансформации клеток. Elledge со своим коллегой Wade Harper выделили ген p21, который является ингибитором Cdc2. Они показали, что мутации в этом гене наблюдаются практически в половине случаев раковых заболеваний. Также Elledge обнаружил ген p57, член семейства p21, который является мутированным в случае заболевания, называемого синдромом Beckwith-Wiedemann, это наследственное заболевание, при котором значительно повышен риск злокачественных новообразований. Другой областью исследования проф. Elledge является изучение вопросов, связанных с распозна-

ванием и репарацией повреждений ДНК. Не так давно ему удалось идентифицировать фермент Chk2, который активирует белок p53 (супрессор опухолевого роста), тем самым, предотвращая деление клеток, имеющих повреждения в молекуле ДНК. В другом своем исследовании Elledge показал, что белок, известный как АТМ, участвует в репарации ДНК. А мутации в гене, кодирующем этот белок, встречаются в 10% случаев рака молочной железы. Кроме этого, Stephen Elledge разрабатывает генетические технологии для создания новых лекарственных препаратов.

Для поддержания и сохранения гомеостаза организма необходимы жесткие системы регуляции процессов, протекающих не только в целом организме, но также и процессов, протекающих на клеточном и молекулярном уровнях. Так, во избежание формирования злокачественных новообразований, в каждой делящейся клетке организма выработались механизмы, контролирующие ее деление. Причем этот контроль осуществляется как внеклеточными, так и внутриклеточными факторами. В процессе старения организма не только снижается пролиферативная активность клеток, но также нарушаются процессы, регулирующие эту активность. Именно поэтому с возрастом повышается риск возникновения онкологических заболеваний. В связи с этим, необходимо детальное изучение механизмов регуляции пролиферации и регенерации, дабы предотвратить и/или предупредить последствия бесконтрольных процессов, протекающих в клетке и в организме, в целом.

Время лабораторного занятия: 3 часа

#### Хронокарта:

1	Организационная часть с мотивацией темы	5 мин
2	Программированный контроль	10 мин
3	Опрос-беседа	35 мин
4	Объяснение препаратов	10 мин
5	Перерыв	15 мин
6	Контроль за самостоятельной работой студентов. Помощь в работе с препаратами	65 мин
7	Подведение итогов. Проверка альбомов	10 мин

**Мотивационная характеристика темы:** Нарушение этапов жизненного цикла клетки приводит к аномалиям развития и патологическим отклонениям, составляющим значительную группу врождённых, наследственных и соматических заболеваний, которые встречаются в медицинской практике. Изучение клеточного цикла, последовательности морфологических изменений в клетке может вооружить врача в предупреждении отклонений от нормы развивающе-

гося организма, ранней цитодиагностике плода, в выявлении хромосомных болезней.

Необходимо отметить значение изучаемой темы для ранней диагностики, успешного лечения, укрепления здоровья людей, предупреждения появления потомства с наследственными заболеваниями. Подчеркнуть, что воздействие неблагоприятных внешних факторов, вредные привычки (курение, алкоголизм) способствуют нарушению жизненного цикла клеток, приводят к порокам развития и опухолевому росту.

#### **Учебная цель**

**Общая цель** – Добиться знания студентами жизненного цикла клетки, знать морфологию фаз митоза, строение и функциональное значение хромосом. Изучить прямое амитотическое деление и эндорепродукцию.

**Конкретная цель** – 1.Указать студентам на особенности периодов клеточного цикла. 2.Научить студентов определять фазы митоза клетки по их морфологии. 3.Указать студентам на особенности строения хромосом в разные фазы митоза. 4.Дать студентам понятие о физиологической и патологической дистрофии клеток. 5.Дать представление о паранекрозе, некрозе и апоптозе клеток.

#### **Необходимый исходный уровень знаний**

**Из других предметов и предшествующих тем:**

- 1.Митоз и его фазы.
- 2.Амитоз – прямое деление клетки.
- 3.Структура хромосомы, хромосомный набор человека.

**Из темы текущего занятия:**

- 1.Клеточный цикл.
- 2.Способы репродукции соматических клеток.
- 3.Структурно-функциональная организация хромосом. Понятие кариотипа.
- 4.Признаки паранекроза, особенности физиологической и патологической дистрофии клетки.
- 5.Некроз и апоптоз клетки.

#### **Вопросы для самоподготовки**

- 1.Способы репродукции протоплазмы
- 2.Клеточный цикл
- 3.Хромосомы, их организация и функция. Хромосомный набор.
- 4.Паранекроз, дистрофия и смерть клетки. Понятие об апоптозе.
- 5.Способы и уровни адаптации клетки.



## Рекомендации для работы на занятии

**Задание 1. Препарат – митоз животной клетки (окр. железный гематоксилин).**

**Программа действий** – На малом увеличении найти, на большом – рассмотреть, зарисовать и отметить хромосомные фигуры во всех фазах митоза.

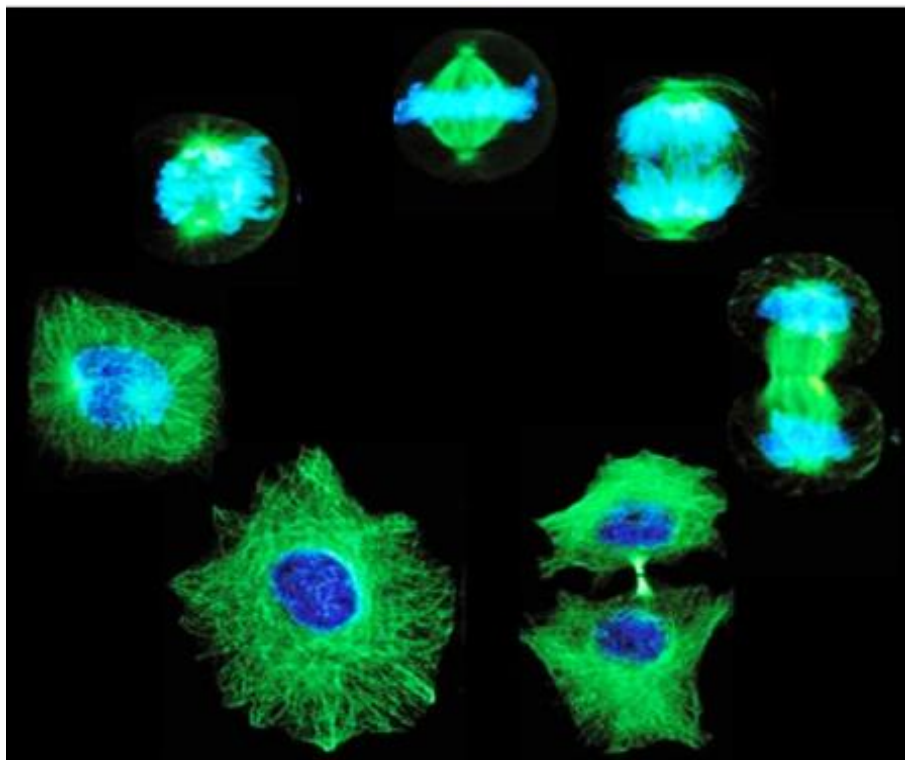


Рис. 63. Митоз. Люминесцентная микроскопия.

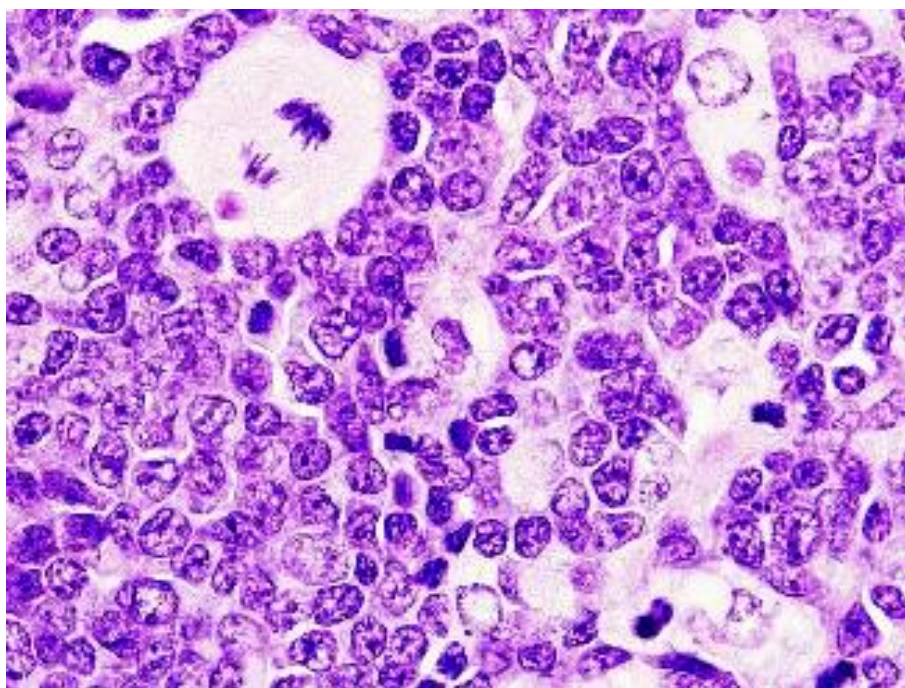


Рис. 64. Митоз. Окраска г/э.

**Задание 2.** Препарат – митоз растительной клетки (окр. железный гематоксилин).

**Программа действий** – На малом увеличении найти, на большом – рассмотреть, зарисовать и отметить хромосомные фигуры на всех стадиях митоза.

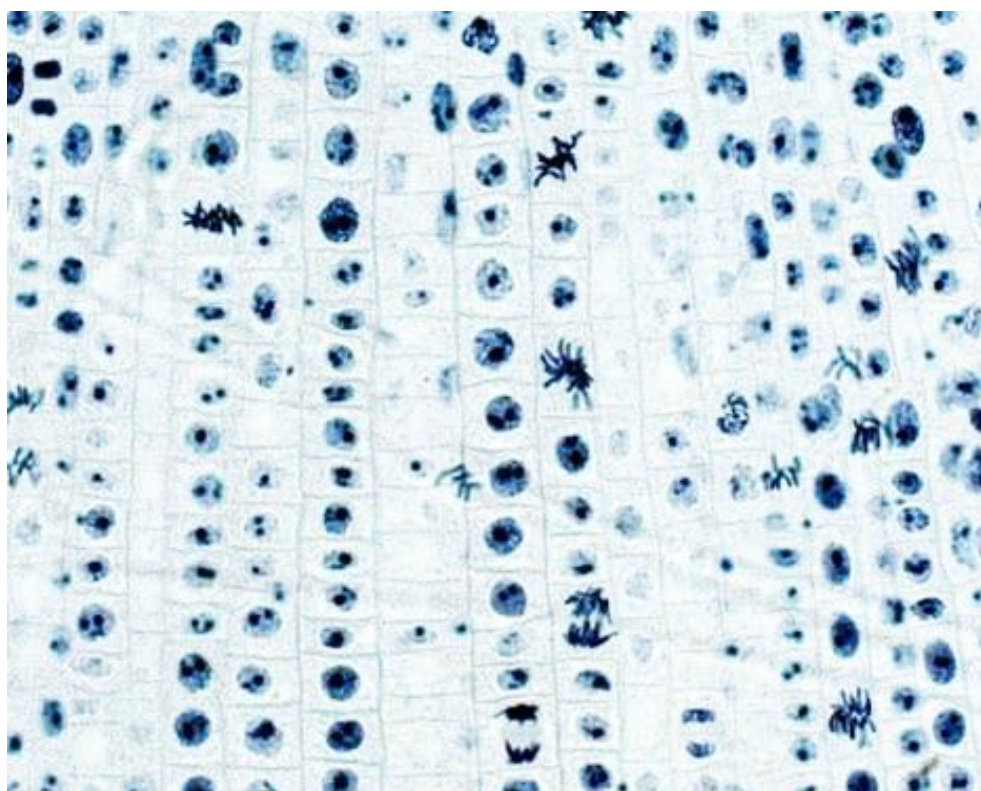
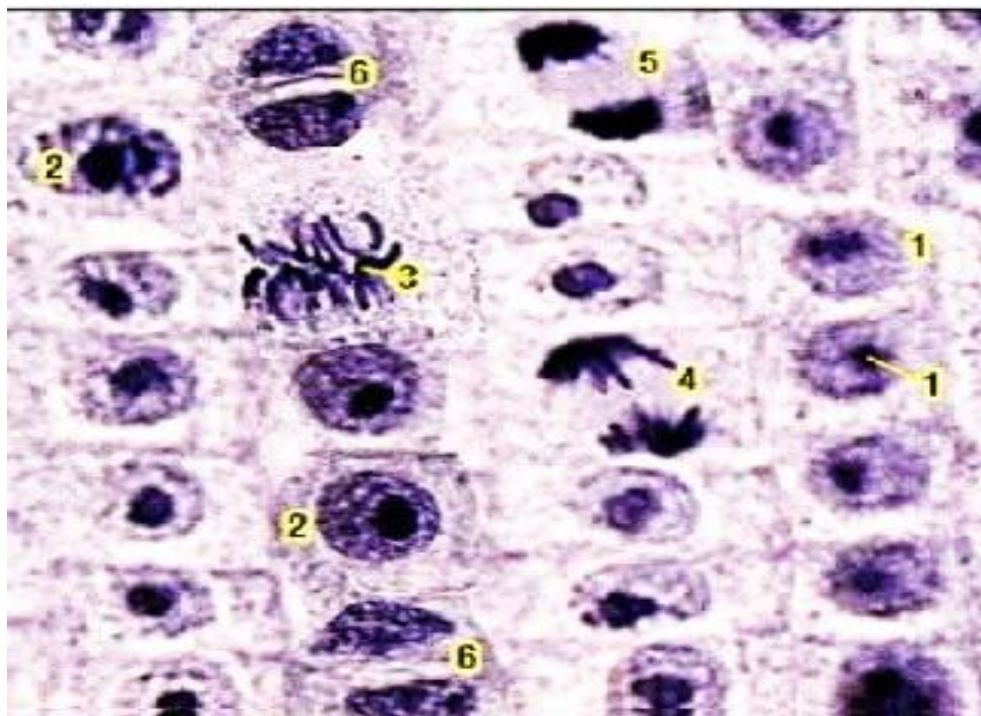


Рис. 65. Митоз.



**Задание 3. Амитоз в переходном эпителии мочевого пузыря (окр. гематоксилин-эозином).**

**Программа действий** – На малом увеличении найти, на большом – рассмотреть и зарисовать: одноядерную клетку (1), клетку с двумя ядрами (2), клетку с перетяжкой цитоплазмы (3),

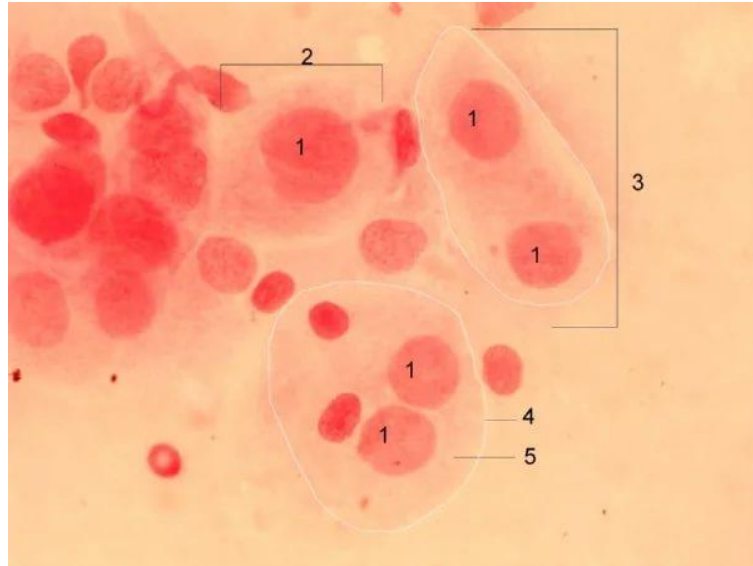


Рис. 66. Амитоз.

**Задание 4. Препарат – кожа с волосом (окр. гем. – эозином), как пример физиологической дистрофии.**

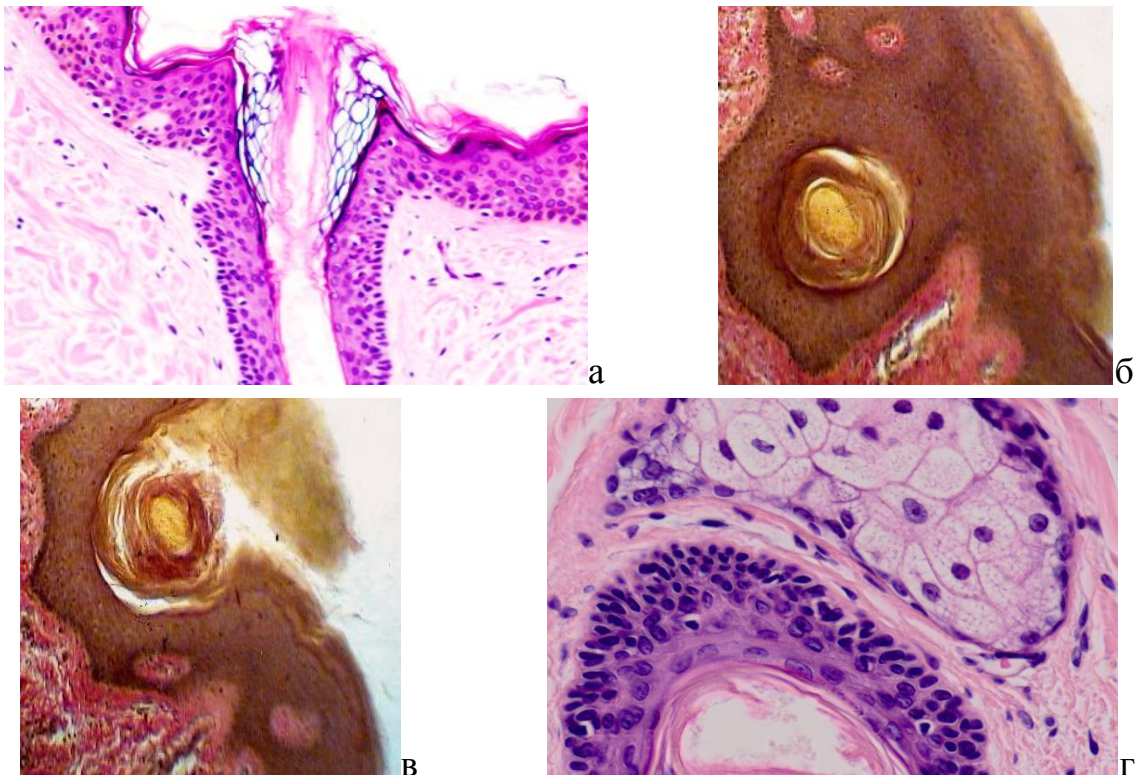


Рис. 67. Кожа человека с волосом (А-в). Г) Сальная железа.  
Фото Рева Г.В., Рева И.В. Окраска г/э.

**Программа действий** – На малом увеличении найти, на большом – зарисовать эпителий (1), волос (2), сальные железы (3).

**Задание 5. Препарат – кровь человека (окр. гем. – эозином).**

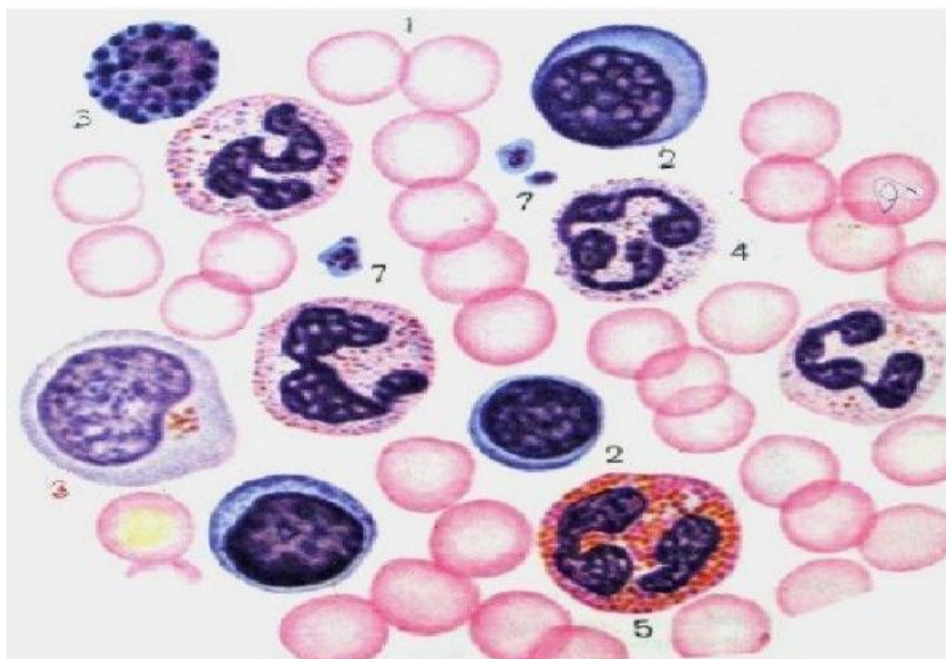


Рис. 68. Кровь человека.

**Программа действий** – На большом увеличении найти эритроциты. Отметить, что это безъядерные клетки – **пример физиологической дистрофии**, клетка при этом функционирует нормально. Присутствие ядра в эритроците – патология.

**Задание 6. Препарат почки – может быть любой препарат (окр. гем. - эозином).**



Рис. 69. Отсутствие гранулообразования. Оераска г/э.

**Программа действий** – На большом увеличении видны клетки канальцев почки. Клетки равномерно адсорбируют краситель, не способны к гранулообразованию. Ядро и цитоплазма мертвой клетки равномерно окрашиваются, так как краситель получает свободный доступ к структурам. **Так выглядит клетка в состоянии паранекроза.**

#### **Ситуационные задачи**

1. В результате действия ионизирующей радиации в некоторых клетках имеет место разрушение отдельных органелл. Каким образом идёт утилизация их остатков?

2. В результате митоза возникло две дочерние клетки. Одна из них вступает в стадию клеточного цикла, вторая в результате дифференцировки потеряла способность к размножению. Какова конечная судьба первой и второй клетки?

3. При исследовании кариотипов обнаружили два вида клеток. Одни из них имели 46 хромосом, а другие – 48. Какие из них принадлежат человеку?

4. Диплоидная соматическая клетка приступила к митотическому делению. Обычный ход митоза был нарушен, в результате чего образовалась одна одноклеточная полиплоидная (тетраплоидная) клетка. Какие этапы митотического цикла прошли нормально? На каком этапе нормальное течение митоза было прервано? Какие причины нарушения нормального хода митотического деления могли привести к формированию одной полиплоидной клетки?

5. На препарате видна митотически делящаяся клетка на стадии анафазы. Сколько хромосом входит в состав каждой дочерней звезды?

6. На препарате видна митотически делящаяся клетка на стадии метафазы. Сколько хромосом входит в состав метафазной пластинки?

7. Микрохирургическим путём амёбу (одноклеточный организм) разделили на два фрагмента: ядросодержащий и безъядерный. Какова дальнейшая судьба этих фрагментов и с чем она связана?

8. Взяли для исследования несколько клеток из эпителия ротовой полости и после специальной обработки гистологического препарата установили, что ядра исследуемых клеток не содержат полового хроматина. Субъекту какого пола (мужского или женского) принадлежали исследуемые структуры?

9. Клетки, выстилающие кишечник имеют щётчатую каёмку. При некоторых болезнях она разрушается. Какая функция клеток при этом пострадает?

10. В клетку проник фактор, нарушающий целостность мембран лизосом. Какие изменения произойдут в клетке?

11. В области раневой поверхности появляется большое количество клеток, содержащих первичные лизосомы, много фагосом и вторичных лизосом. Каково функциональное значение этих клеток?



12. На препарате наблюдается уменьшение размеров клеточных ядер, их уплотнение, сморщивание, более сильное окрашивание хроматина, чем в неизменённых ядрах. Как называется это явление? Что можно сказать о функциональном состоянии этих клеток?

### **Техническое обеспечение учебного процесса**

1. Тестовый контроль с использованием пакета компьютерных программ;  
2. Обеспечение иллюстративной части занятия наглядными пособиями (стенды, таблицы, электроннограммы) с использованием мультимедиа (Multimedia Projector DV – thenter);  
3. Микроскопы  
4. Наборы учебных и демонстрационных препаратов.  
5. Фото с сайта [Molecular Expressions™](http://www.molecularexpressions.com), 10 gif-анимации – по материалам [Nikon MicroscopyU](http://www.nikonmicroscopyu.com) с блога [It's Okay To Be Smart](http://www.itsokaytobesmart.com)). (Интернет ссылка: <http://www.microscopyu.com/moviegallery/c1si/mitosiseb3/index.html>)

<http://kozlenkoa.narod.ru/mitoz.htm>

<http://www.itsokaytobesmart.com/post/37186578911/infinity-imagined-time-lapse-of-epithelial>

Апоптоз. Видеоанимация.

<http://yandex.ru/yandsearch?text=%D0%B0%D0%BF%D0%BE%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%B7%20%D0%B2%20%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BC%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8&clid=1946579&lr=75&csg=1478%2C3191%2C18%2C8%2C0%2C1%2C0>

**Домашнее задание** – см. учебно-методическую разработку лабораторных занятий для студентов по теме: **Семинар по разделу «Цитология».**

## ТЕМА 6. СЕМИНАР «ЦИТОЛОГИЯ»

### Краткое содержание темы

См. краткое содержание по предыдущим темам: «Формы организации живой материи». «Морфология обмена веществ в клетке». «Способы репродукции клетки. Реакция клетки на повреждение»

Время лабораторного занятия: 3 часа

### Хронокарта:

1	Организационная часть с мотивацией темы	5 мин
2	Семинар-беседа, коррекция знаний	55 мин
3	Перерыв	15 мин
4	Тест-контроль по разделу «Цитология»	65 мин
5	Подведение итогов.	10 мин

Мотивационная характеристика темы. Знание гистофизиологии клеток, жизненного цикла клеток, способов репродукции и реакции их на внутренние и внешние воздействия необходимы будущему врачу для понимания механизмов, вызывающих различные заболевания в организме. В широком смысле слова, на этой основе идет формирование врачебного мышления при диагностике болезней и эффективности их лечения.

### Учебная цель.

**Общая цель** – установить уровень знаний студентов по цитологии.

Конкретная цель – 1. Знать первичные формы организации протоплазмы.

2. Знать структуру и функции клеток, жизненный цикл и реакцию клеток на повреждение. 3. Уметь читать электронограмму.

### Необходимый исходный уровень знаний.

### Из других предметов и предшествующих тем:

Понятие о клетке.

Клеточная теория.

Митоз.

Понятие о хромосомном наборе человека.

### Вопросы для самоподготовки

1. Гистология как наука, ее признаки.
2. Гистология как учебная дисциплина, ее основные разделы.
3. Исторические этапы развития гистологии.
4. Клеточная теория как научная основа гистологии, её основные положения.
5. Клетка как главная форма организации протоплазмы.

6. Симпласт и синцитий как адаптивные формы организации протоплазмы.
7. Межклеточное вещество как продукт жизнедеятельности клеток.
8. Величина и форма клеток, факторы их лимитирующие.
9. Классификация цитоплазматических органелл.
10. Клеточная поверхность, её свойства и функции.
11. Основные функции клетки.
12. ГЭРЛ – система и поток мембран в клетке.
13. Регуляция синтеза белка в клетке.
14. Митохондрии и их энергетические функции.
15. Способы репродукции клеток (Митоз, эндомиоз).
16. Клеточный цикл.
17. Хромосомы и их организация, функции. Хромосомный набор человека.
18. Паранекроз, дистрофия и смерть клетки (апоптоз и некроз клетки).
19. Способы и уровни адаптации клетки.

#### **Рекомендации для работы на занятии**

**Задание 1. Опрос-беседа по теме – «Цитология», см. вопросы для самоподготовки.**

**Задание 2. Тест–контроль по «Цитологии».**

**Задание 3. Диагностика и чтение электронограмм, см. учебные стенды по цитологии.**

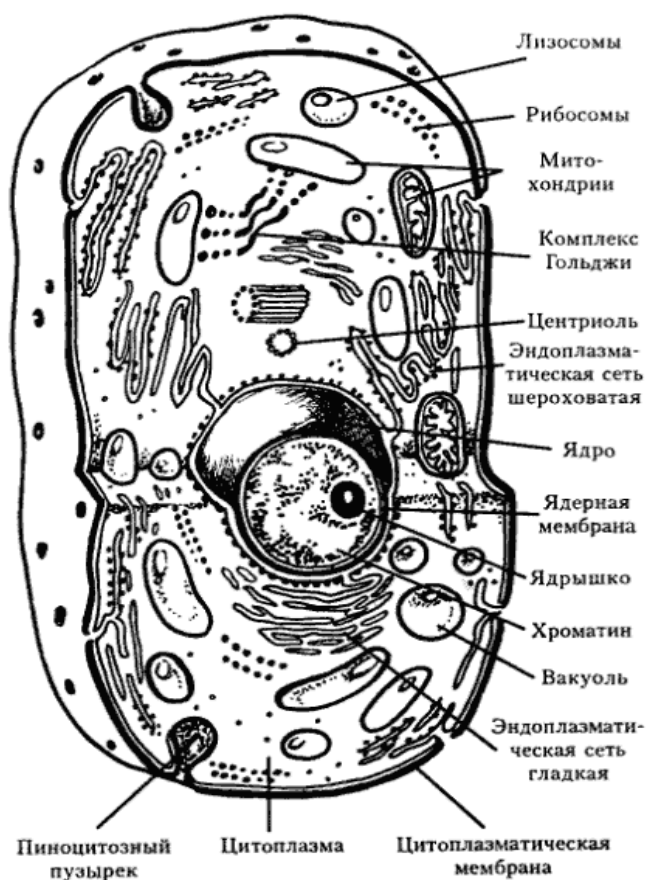
#### **Техническое обеспечение учебного процесса**

1. Тестовый контроль с использованием пакета компьютерных программ;
2. Обеспечение иллюстративной части занятия наглядными пособиями (стенды, таблицы, электронограммы) с использованием мультимедиа (Multimedia Projector DV – thenter);
3. Микроскопы
4. Наборы учебных и демонстрационных препаратов.

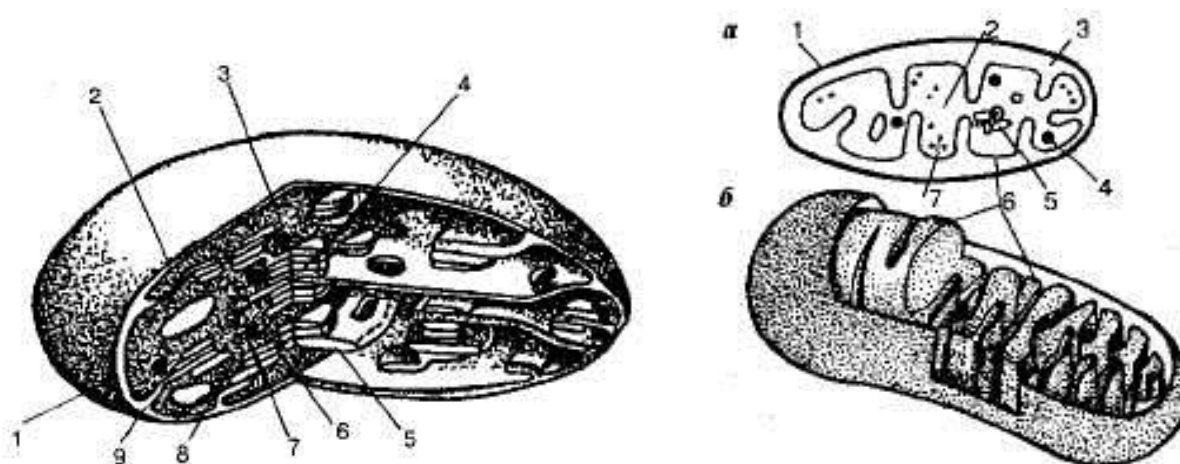
**Домашнее задание – см. учебно-методическую разработку лабораторных занятий для студентов по теме: «Эпителиальные ткани».**

## ПРИЛОЖЕНИЯ

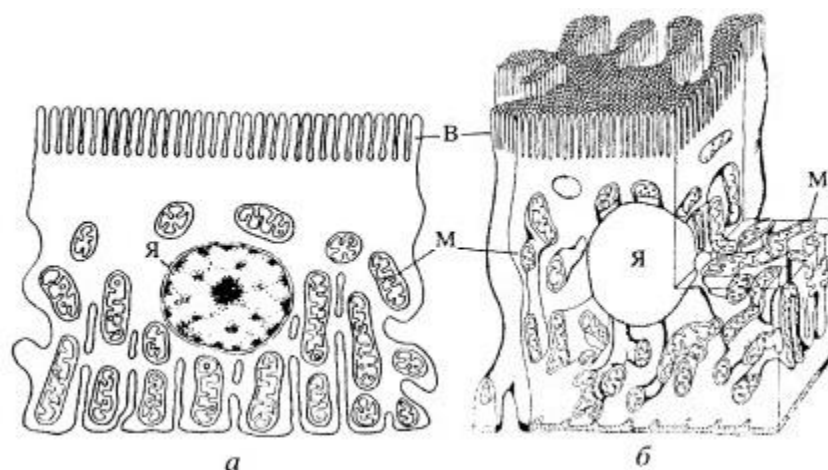
### Электроннограммы:



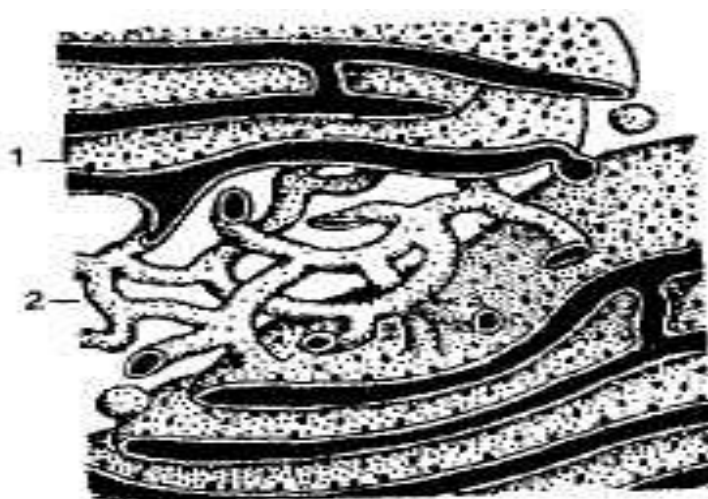
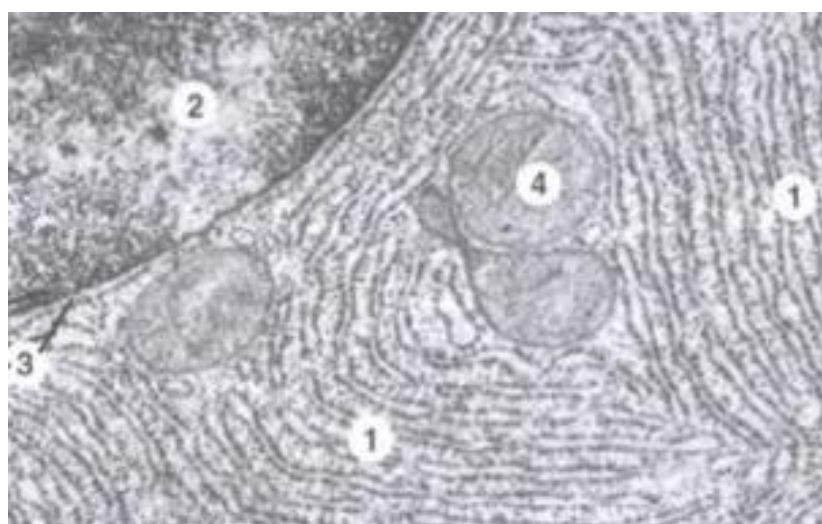
1. Клетка.



2. Митохондрия. Схема строения митохондрии: а – продольный разрез; б – схема трехмерного строения; 1 – внешняя мембрана; 2 – матрикс; 3 – межмембранное пространство; 4 – гранула; 5 – ДНК; 6 – внутренняя мембрана; 7 – рибосомы.

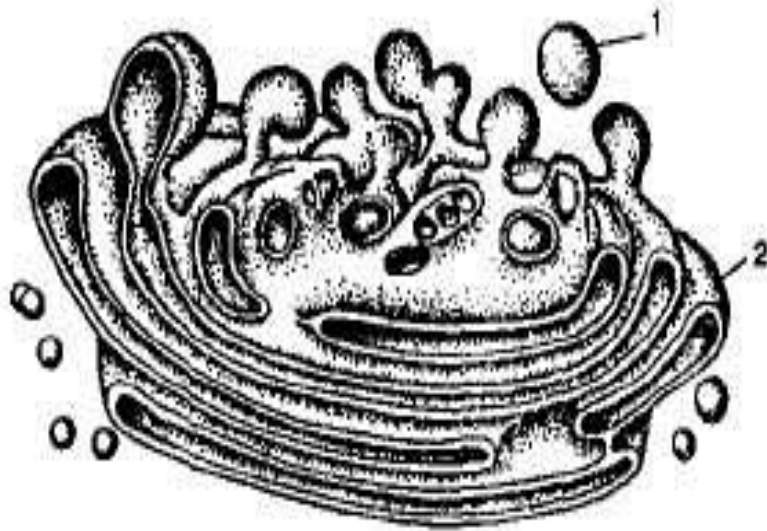


3. Митохондриальный ретикулум в базальной части клетки извитого канальца почки крысы (Bergeron et al., 1980) *а* – срез клетки; *б* – трехмерная реконструкция. М – митохондрии; В – микроворсинки; Я – ядро.

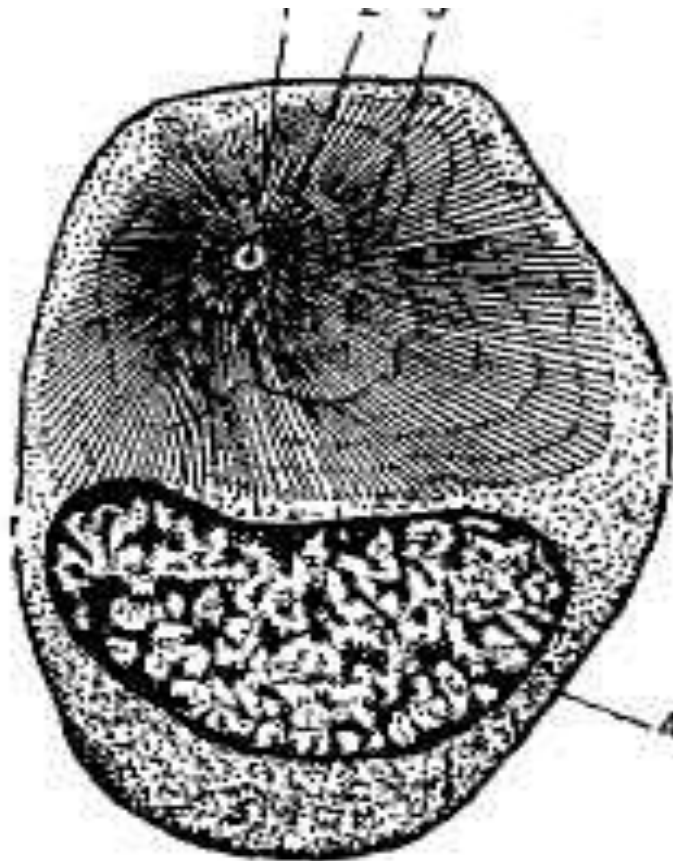


4. Гранулярная ЭПС: а) электронограмма ЭПС: 1. Канальцы ЭПС; 2. ядро клетки; 3. нуклеолема; 4. Митохондрии. Б) Схема строения шероховатого (1) и гладкого (2) эндоплазматического ретикулума. 7. Гладкая ЭПС.

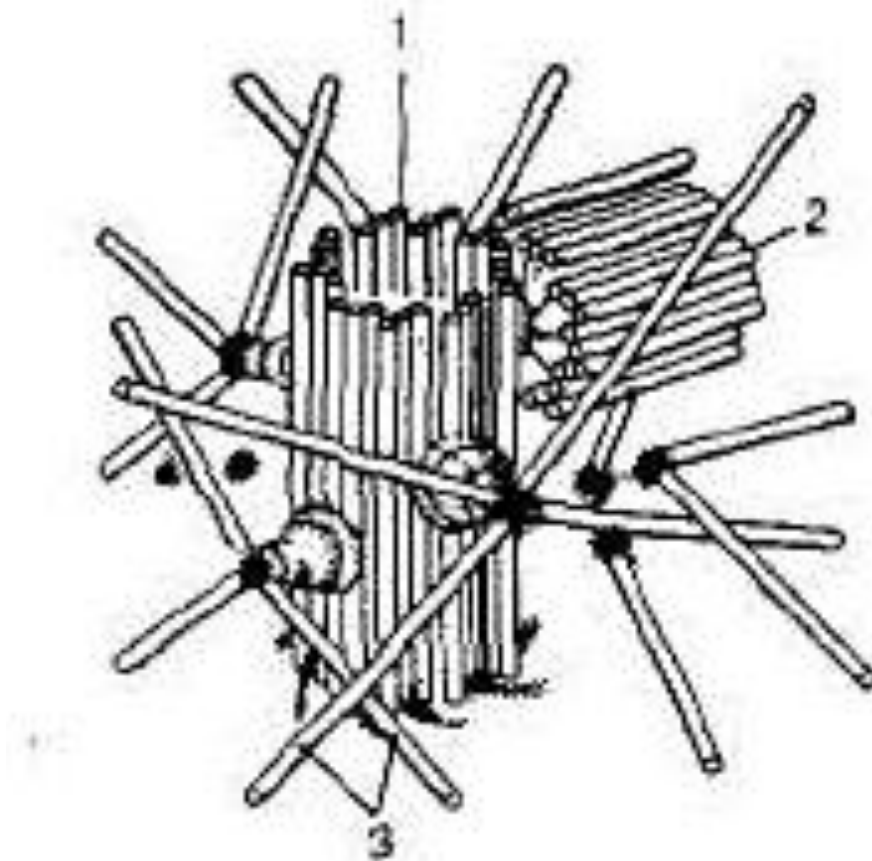




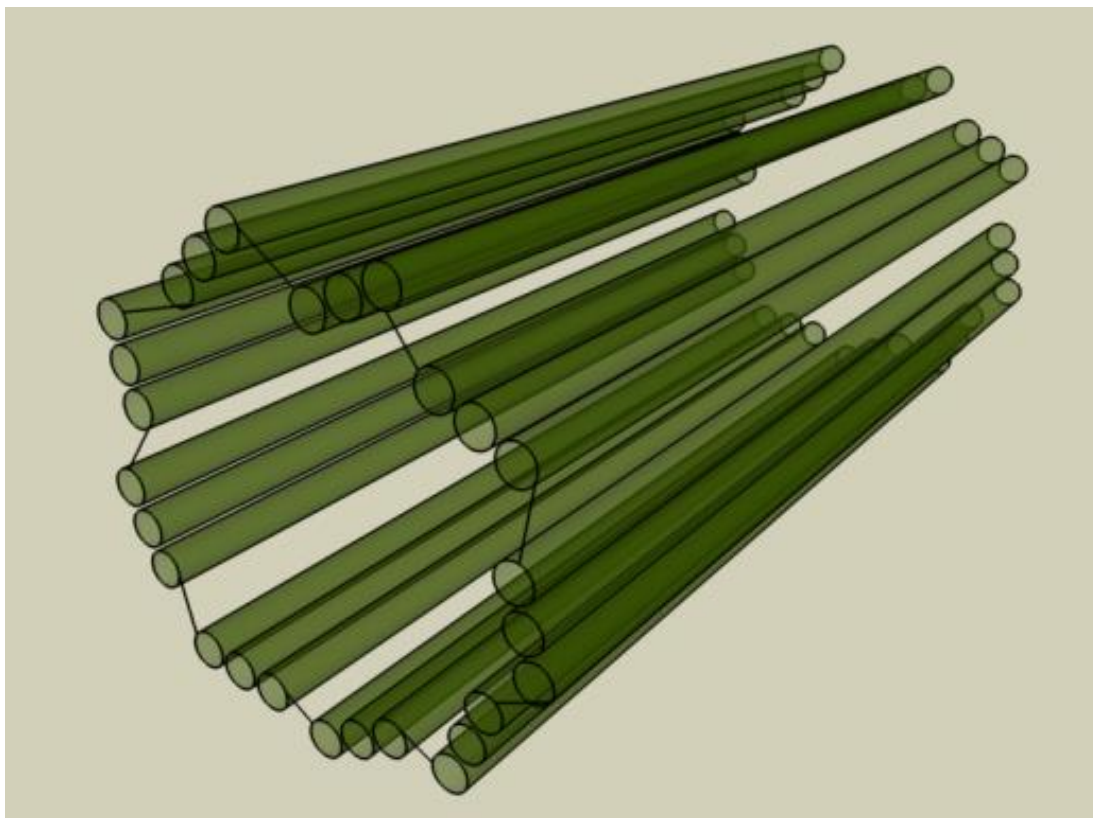
5. Комплекс Гольджи. Схема строения аппарата Гольджи:  
1 – пузырьки; 2 – цистерны.



6. Клеточный центр. (Открыт В. Флемингом в 1875 г). 1. центриоль;  
2. светлая цитоплазма, окружающая центриоль;  
3. центросфера; 4. Ядро.



7. Схема строения центриолей: 1. Материнская центриоль;  
2. Дочерняя центриоль; 3. Микротрубочки.



8. Модель центриоли. Изображены девять триплетов микротрубочек

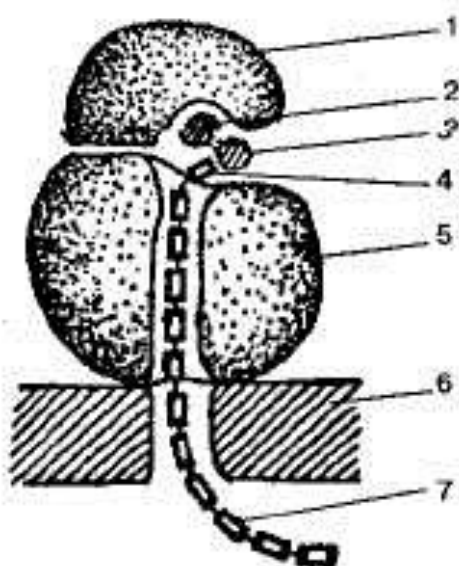
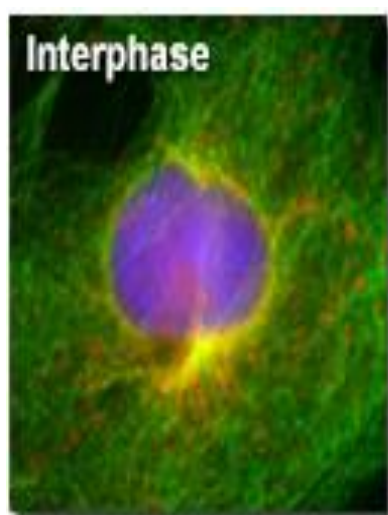
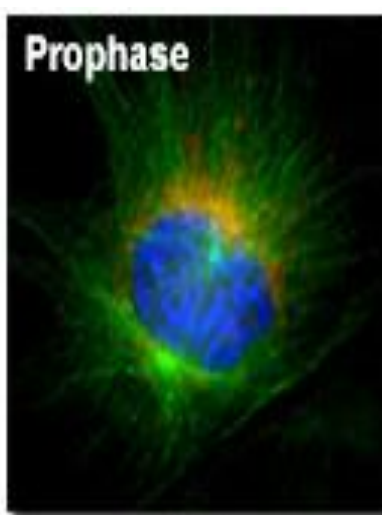


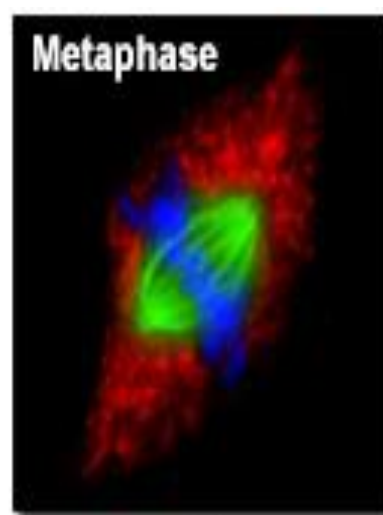
Схема строения рибосомы: 1 – малая субъединица; 2 – иРНК; 3 – тРИК;  
 4 – аминокислота; 5 – большая субъединица; 6 – мембрана эндоплазматической сети;  
 7 – синтезируемая полипептидная цепь.



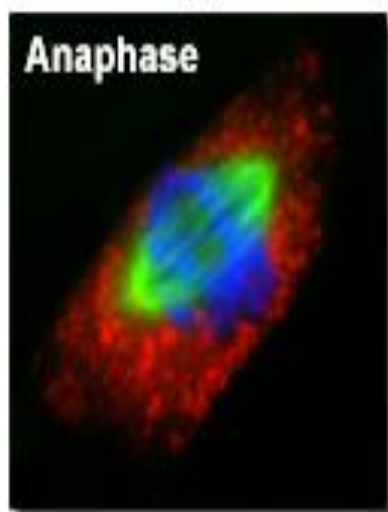
(a)



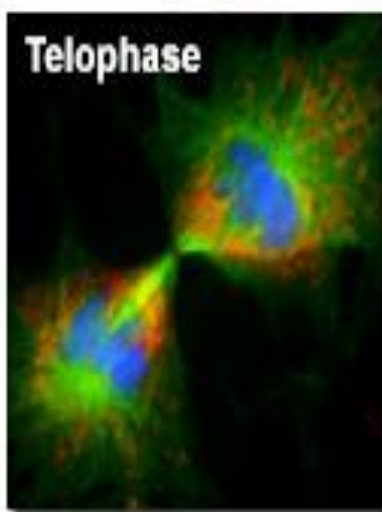
(b)



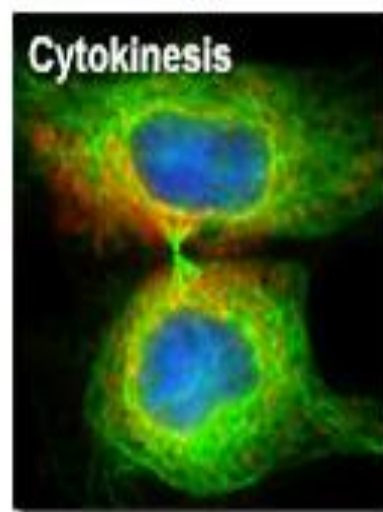
(c)



(d)

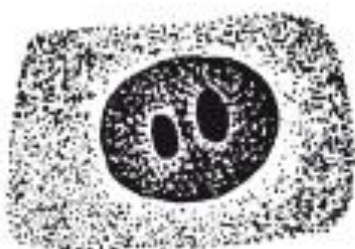


(e)

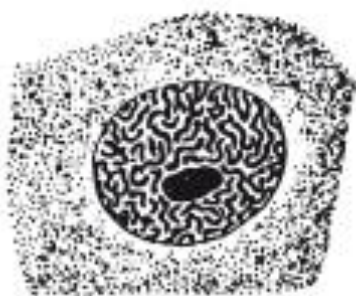


(f)

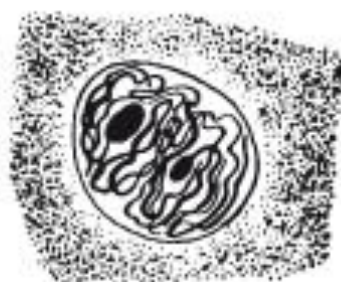




1



2



3



4



5



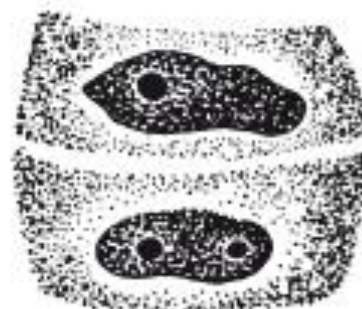
6



7



8



9

## ТЕСТЫ ПО ЦИТОЛОГИИ

Укажите один правильный ответ

1. Первичные формы организации протоплазмы. Верно все, кроме
  - а) клетка
  - б) симпласт
  - в) синцитий
  - г) коацерват
2. Органеллы ГЭРЛ-системы, верно все, кроме
  - а) лизосома
  - б) эндоплазматическая сеть
  - в) митохондрия
  - г) аппарат Гольджи
3. Назовите органеллы, образующие эргастоплазму
  - а) Аппарат Гольджи
  - б) лизосомы
  - в) канальцы и цистерны
  - г) митохондрии
4. Назовите включения в гепатоцитах при болезни Гирке
  - а) липиды
  - б) белки
  - в) пигменты
  - г) гликоген
5. Какие органеллы повреждены при болезни Тей-Сакса
  - а) рибосомы
  - б) аппарат Гольджи
  - в) лизосомы
  - г) центросома
  - д) все перечисленное
6. Назовите состав митохондрии
  - а) гладкие мембраны



- б) матрикс
- в) кристы
- г) элементарные единицы величиной в 10 нм
- д) все перечисленное

7. Назовите элементы ядра

- а) ядрышко
- б) хромосомы
- в) нуклеоплазма
- г) двойная покровная мембрана
- д) все перечисленное

8. Клетка, реагирующая на окружение образованием рабочих экспрессированных генов

- а) компетентная
- б) комитированная
- в) детерминированная
- г) специализированная

9. Назовите гены дифференцировки клеток

- а) конститутивные
- б) индуцибельные
- в) и те, и другие
- г) ни те, ни другие

10. В какую фазу митоза происходит элиминация ядерного хроматина и дезорганизация ЭПР

- а) интерфаза
- б) профаза
- в) метафаза
- г) анафаза
- д) телофаза

11. Самая короткая по времени стадия митоза – это

- а) профаза
- б) метафаза
- в) анафаза
- г) телофаза
- д) зиготена

12. Белки внутриклеточных мембран синтезируются в
- а) гранулярной ЭПС
  - б) гладкой ЭПС
  - в) комплексе Гольджи
  - г) лизосомах
  - д) ядрышках
13. Цитоскелет клетки представлен. Верно все, кроме
- а) актиновыми филаментами
  - б) микротрубочками
  - в) промежуточными филаментами
  - г) системой внутриклеточных мембран
14. Какая из клеточных органелл состоит из диктиосом
- а) аппарат Гольджи
  - б) центросома
  - в) хондриосома
  - г) диплосома
  - д) все перечисленное
15. Функциями гранулярной эндоплазматической сети являются
- а) синтез экспортируемых белков
  - б) изоляция белков от гиалоплазмы
  - в) химическая модификация синтезируемых белков
  - г) транспорт в аппарат Гольджи
  - д) все перечисленное
16. Функция аппарата Гольджи. Верно все, кроме
- а) сортировка белков по различным транспортным пузырькам
  - б) гликозилирование белков
  - в) синтез стероидных гормонов
  - г) упаковка секреторного продукта
17. В какой фазе клеточного цикла происходит синтез ДНК
- а) G<sub>0</sub>
  - б) G<sub>1</sub>
  - в) G<sub>2</sub>
  - г) S

д) М

18. Гликокаликс. Верно все, кроме

- а) Содержит белки ионных каналов
- б) Обеспечивает пристеночное пищеварение
- в) Участвует в клеточной адгезии и клеточном узнавании
- г) Образован олигосахаридами

19. Что синтезирует митохондриальная ДНК

- а) 13 пептидов
- б) 22 тРНК
- в) 2 формы рРНК
- г) все перечисленное

20. Ионы кальция депонируются в

- а) Гранулярной ЭПС
- б) Гладкой ЭПС
- в) Комплексе Гольджи
- г) Лизосомах
- д) Все перечисленное

21. Структуры, формирующие клеточную поверхность. Верно все, кроме

- а) супраембранный комплекс
- б) цитоплазматическая мембрана
- в) субмембранный комплекс
- г) эндоплазматическая сеть

22. Какие органеллы клетки выполняют секреторную функцию

- а) гранулярная эндоплазматическая сеть
- б) агранулярная эндоплазматическая сеть
- в) плазиолема
- г) комплекс Гольджи

23. Какие структуры характерны для митохондрий

- а) наружная мембрана
- б) внутренняя мембрана
- в) кристы
- г) матрикс
- д) все перечисленное

24. В какой органелле клетки содержится собственная ДНК

- а) комплекс Гольджи
- б) лизосомы
- в) эндоплазматическая сеть
- г) митохондрии
- д) клеточный центр

25. Производными цитолеммы на свободной поверхности эпителиоцитов являются

- а) десмосомы
- б) базальные инвагинации
- в) микроворсинки щеточной каемки
- г) полудесмосомы
- д) нексусы

## **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ**

1. В чём ошибка лаборанта, фиксирующего материал для исследования углеводов в ткани (гликоген в клетках печени) в водном растворе фиксатора?

2. В каком растворе фиксируют ткань для изучения содержания жиров?

3. На электронограммах представлены 2 мембраны. Как идентифицировать мембрану ядра?

4. Определите на препаратах, где включения углеводов, а где углеводная дистрофия.

5. Дайте характеристику клетки, на электронограмме которой в цитоплазме большое количество свободных рибосом.

6. Приведите пример клетки, в которой могут присутствовать как гладкая, так и гранулярная эндоплазматическая сеть.

7. Назовите особенности ультраструктуры стволовой клетки.

8. На электронограмме клетка с сохранной цитолеммой, но с инвагинирующей кариолеммой. Назовите состояние клетки.

9. В микропрепарате видна неклеточная структура, содержащая множество ядер в цитоплазме и ограниченная общей биологической мембраной. Как называется такая структура?

10. Под большим увеличением микроскопа в поле зрения обнаружена группа клеток, которые после митоза сохраняют связь друг с другом в виде тончайших цитоплазматических перемычек. Как называются такие скопления клеток? В каких органах они могут встречаться?

11. При ультрамикроскопическом исследовании клетки на одной из её поверхностей видны многочисленные выросты цитоплазмы, ограниченные плазмолеммой и содержащие микроканалы. Как называются эти структурные образования? Каково их функциональное значение?

12. На электроннограмме в цитоплазме панкреоцита видны полостные мембранные образования в виде канальцев и цистерн, на поверхности которых обнаруживаются многочисленные зернистые структуры. О какой органелле общего значения может идти речь? Что представляют зёрна на её поверхности и какова их функция?

13. В цитоплазме при ультрацитохимических исследованиях обнаружены вакуолизированные тельца, ограниченные мембраной. В их содержимом выявлена высокая концентрация различных гидролаз. О каких структурных образованиях идёт речь? Какие их разновидности (типы) Вам известны? Какие функции они выполняют?

14. На электроннограмме миосимпласта видны удлинённые полостные образования, ограниченные двумя мембранами, внутренняя из которых образует выпячивания во внутрь полостей. Идентифицируйте эти структуры. Какие функции они выполняют?

15. Под электронным микроскопом в цитоплазме glanduloцита околоушной слюнной железы выявлены многочисленные тельца размером до 20-25 нм, в которых при цитохимическом исследовании обнаружена резко позитивная реакция на белки и РНК. Что представляют эти структурные образования? Какие их разновидности Вам известны? Какие функции они выполняют?

16. Клетку обработали веществами, нарушающими конформацию белков, входящих в состав плазмолеммы. Какие функции клеточной мембраны будут нарушены?

17. Известно, что некоторые клетки обладают высокой подвижностью. Какие образования клеточной поверхности обеспечивают этот процесс?

18. За пределами плазмолеммы находятся ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , концентрация которых внутри клетки больше, чем снаружи. Возможно ли поступление этих ионов в клетку? Если возможно, то каков механизм такого транспорта?

19. При перемещении клетка встретила частицу органического вещества. Каков возможный механизм поступления этого вещества в клетку?

20. Методом электронной гистохимии установлено, что в цитоплазме клеток печени в процессе жизнедеятельности могут появляться и исчезать розеткообразные структуры, содержащие гликоген. Как называются такие структуры клетки?



21. В цитоплазме клеток поджелудочной железы в процессе секреторного цикла в апикальной части появляются и исчезают гранулы секрета. К каким структурным элементам клетки можно отнести эти гранулы?

22. На трех препаратах представлены клетки. У одной – хорошо развиты микроворсинки, у другой – реснички, третья имеет длинные отростки. Какая из этих клеток специализирована на процесс всасывания?

23. На свободной поверхности клеток выявляются структуры, в которых под электронным микроскопом видны 9 пар периферических и 2 пары центральных микротрубочек. Как называются эти структуры и какова их роль?

24. При исследовании различных клеток под электронным микроскопом было обнаружено, что одни на свободной поверхности имеют единичные микроворсинки, другие – щеточную каемку. Какое можно сделать заключение о функции этих клеток?

25. При исследовании под электронным микроскопом изолированной клетки на одной её поверхности были обнаружены мерцательные реснички, на другой – десмосомы. Какая из указанных поверхностей свободная, а какая контактирующая?

26. Эпителиальные клетки, выстилающие полость кишечника, имеют щеточную каёмку. При некоторых патологических состояниях она разрушается. Какая функция клеток при этом страдает?

27. Известно, что при вдыхании паров четырёххлористого углерода происходит нарушение целостности мембран лизосом гепатоцитов. Какие изменения произойдут в них?

28. В результате действия ионизирующей радиации в некоторых клетках имеет место разрушение отдельных органелл. Каким способом будет осуществляться утилизация их остатков?

29. В области раневой поверхности появляется большое количество клеток, содержащих первичные лизосомы, много фагосом и вторичных лизосом. Каково функциональное значение этих клеток?

30. В процессе жизнедеятельности клетки резко увеличивается число цистерн и канальцев агранулярной эндоплазматической сети. Синтез каких веществ активируется в клетке?

31. С помощью микроманипулятора из клетки удалили центриоль клеточного центра. Как это отразится на дальнейшей жизнедеятельности клетки?

32. На клетки подействовали препаратом, изменяющим структуру рибосом. Какие процессы в первую очередь будут нарушены?

33. С помощью микроманипулятора из клетки удалили комплекс Гольджи. Как это отразится на её дальнейшей жизнедеятельности?

34. Клетку обработали веществом, блокирующим процесс фосфорилирования нуклеотидов в митохондриях. Какой процесс жизнедеятельности клетки будет нарушен?

35. Клетку обработали колхицином – веществом, разрушающим микротрубочки и микрофиламенты. Какие функции клетки пострадают?

36. Культуру ткани обработали препаратом, блокирующим функцию ядершек. Как это отразится на жизнедеятельности клеток?

37. Культуру ткани обработали препаратом, избирательно разрушающим белки-гистоны. Какая структура при этом пострадает в первую очередь?

38. Культуру ткани обработали химическим веществом, которое временно блокирует синтетические процессы в премитотическом периоде клеточного цикла. В какой период клеточного цикла клетки вступят с опозданием?

39. На клетку действовали колхицином, блокирующим сборку белков – тубулинов, входящих в состав ахроматинового веретена. Какие этапы митотического цикла будут нарушены?

40. В результате митоза возникло две дочерние клетки. Одна из них вступает в стадию клеточного цикла, вторая – в результате дифференцировки теряет способность к размножению. Какова конечная судьба первой и второй клетки?

41. При исследовании кариотипа собаки и свиньи обнаружены два вида клеток. Одни из них имели 40 хромосом, а другие – 78. Какие из них принадлежат собаке?

42. В процессе митоза диплоидной соматической клетки обычный его ход был нарушен, в результате чего образовалась одна одноядерная тетраплоидная клетка. Какие этапы митотического цикла прошли нормально? На каком этапе нормальное течение митоза было прервано? Какие причины нарушения нормального хода митотического деления могли привести к формированию одной полиплоидной клетки?

43. На митотически делящуюся соматическую диплоидную клетку действовали препаратом, который очень быстро разрушает веретено деления, в результате чего нормальное течение митоза было нарушено. На каком этапе прервано нормальное течение митоза? Сколько ядер образуется в результате такого митотического деления? Какой набор хромосом будет содержать образовавшееся ядро (или ядра)?

44. В микропрепарате видна митотически делящаяся диплоидная клетка на стадии анафазы. Сколько хромосом входит в состав каждой дочерней звезды?

45. В гистологическом препарате видна митотически делящаяся диплоидная клетка на стадии метафазы. Сколько хромосом входит в состав метафазной пластинки?

46. С помощью микроманипулятора хирургическим путем амебу разделили на два фрагмента: ядросодержащий и безъядерный. Какова дальнейшая судьба этих фрагментов и с чем она связана?

47. В процессе судебного разбирательства в генетическую лабораторию для установления половой принадлежности была направлена свинина. После специальной обработки нескольких клеток было установлено, что их ядра не содержат полового хроматина. Животному какого пола принадлежали исследуемые структуры?

48. В микропрепарате в целом ряде клеток обнаружено уменьшение размеров клеточных ядер, их уплотнение, сморщивание и более интенсивное окрашивание хроматина, чем в неизмененных ядрах. Как называется это явление? Что можно сказать о функциональном состоянии клетки?

49. Под электронным микроскопом в цитоплазме миоцита выявлена мембранная система микроканальцев, вакуолей и трубочек с гладкой поверхностью. При цитохимических исследованиях в ней обнаружены ионы кальция. Как называется эта система? Какие функции она выполняет?

50. На электроннограмме видны небольшие скопления мембранных образований, состоящие из канальцев и уплощённых цистерн, которые на периферии имеют расширения в виде мешочков. Относительно ядра они полярны. Назовите эти структуры. Какие функции они выполняют?

51. При окраске гематоксилин-эозином в препарате видны клетки. Цитоплазма одних базофильна, а других оксифильна. Какие вещества, присутствующие в цитоплазме, обуславливают её такие тинкториальные свойства?

52. На электроннограмме миосимпласта видны тяжистые полостные образования, ограниченные двумя мембранами, внутренняя из которых образует выпячивания во внутрь полостей. Идентифицируйте эти структуры. Какие функции они выполняют?

53. Клетку обработали веществами, нарушающими конформацию белков, входящих в состав цитолеммы. Какие функции клеточной мембраны будут нарушены?

54. Известно, что в культуре ткани клетки могут прикрепляться к субстрату и образовывать клеточные агрегаты. Какие структуры клетки принимают в этом участие?

**СПИСОК УЧЕБНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ  
И ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКОЕ  
ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Основная литература**

*(электронные и печатные издания)*

1. Банин В.В. Цитология. Функциональная ультраструктура клетки. Атлас : учебное пособие / В. В. Банин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 264 с. : ISBN 978-5-9704-3891-6. – URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970438916.html>; <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=25999821>
2. Банин В. В. и др.] ; под ред. В. В. Банина, В. Л. Быкова ; Federative international committee on anatomical terminology (FICAT), Российская гистологическая номенклатурная комис., Российское мед. науч. о-во анатомов, гистологов и эмбриологов. ГЭОТАР-Медиа, 2009. Москва, 2009. – 272 с. – ISBN 978-5-9704-1443-9.
3. Данилов Р.К., Боровая Т.Г. Histology, Embryology, Cytology. Textbook. ГЭОТАР-Медиа.-- 2022. – 480 с. – ISBN 978-5-9704-6385-7. – URL: [https://medknigaservis.ru/product/histology-embryology-cytology-texbook/?utm\\_source=feed&utm\\_campaign=cpc&utm\\_content=291339&utm\\_medium=cpc&utm\\_term=291339&utm\\_medium=cpc&utm\\_source=priceru-gmc&utm\\_campaign=626000824&utm\\_content=1374650532](https://medknigaservis.ru/product/histology-embryology-cytology-texbook/?utm_source=feed&utm_campaign=cpc&utm_content=291339&utm_medium=cpc&utm_term=291339&utm_medium=cpc&utm_source=priceru-gmc&utm_campaign=626000824&utm_content=1374650532)
4. Данилов Р.К. Гистология, эмбриология, цитология: Атлас-справочник. – ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 432 с. – ISBN 978-5-9704-6335-2. URL: <https://medknigaservis.ru/product/gistologiya-embriologiya-tsitologiya-atlas-spravoc-hnik/>
5. Быков Владимир Лазаревич, Юшканцева София Исидоровна. Гистология, цитология и эмбриология. Атлас. – Издательство: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 296 с. – ISBN 978-5-9704-2188-8. – URL: [https://www.labirint.ru/books/332711/point/gm/?point=gg37&utm\\_source=g\\_ads&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=smart\\_shopping\\_hudogka&product\\_partition\\_id=377094676304&product\\_id=332711&gclid=EAIaIQobChMIyeTq3oK88wIVDJ53Ch1QKgh6EAQYBSABEgKxivD\\_BwE](https://www.labirint.ru/books/332711/point/gm/?point=gg37&utm_source=g_ads&utm_medium=cpc&utm_campaign=smart_shopping_hudogka&product_partition_id=377094676304&product_id=332711&gclid=EAIaIQobChMIyeTq3oK88wIVDJ53Ch1QKgh6EAQYBSABEgKxivD_BwE)
6. Самусев Р., Смирнов А.В. Атлас по цитологии, гистологии и эмбриологии : учебное пособие. – ГЭОТАР-Медиа. – 2021. – 624 с. – ISBN: 978-5-9704-6226-3. – URL: [https://www.labirint.ru/books/812929/Гистология, эмбриология, цитология \[Электронный ресурс\] / Ю. И. Афанасьев; Н. А. Юрина; Я. А. Винников; А. И. Радостина; Ю. С. Ченцов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019. – URL: http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970429525.html](https://www.labirint.ru/books/812929/Гистология, эмбриология, цитология [Электронный ресурс] / Ю. И. Афанасьев; Н. А. Юрина; Я. А. Винников; А. И. Радостина; Ю. С. Ченцов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019. – URL: http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970429525.html)
7. Гистология, эмбриология, цитология [Электронный ресурс] : учебник / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский и др. ; под ред.

Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. – 6-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970436639.html>

8. Гистология, цитология и эмбриология. Атлас [Электронный ресурс] : учебное пособие / Быков В.Л., Юшканцева С.И. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 296 с. <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970432013.html>

9. Курс лекций по гистологии (П.А. Мотавкин), Владивосток, «Медицина ДВ», 2007.-359 с.

10. Гистология, эмбриология, цитология [Электронный ресурс]: учебник / Н. В. Бойчук, Р. Р. Исламов, Э. Г. Улумбеков, Ю. А. Челышев ; под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Челышева – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970437827.html>

11. Гистология и эмбриональное развитие органов полости рта человека [Электронный ресурс] / В.Л. Быков – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970430118.html>

#### **Дополнительная литература (печатные и электронные издания)**

12. Микроскопическая техника. Руководство.- Саркисов Д. С., Перов Д. С. М., Медицина.-1996.- 544 с..

13. Ромейс Бенно. Микроскопическая техника. Издательство иностранной литературы. -2009.- 336 с.

14. Курс лекций по гистологии (П.А. Мотавкин), Владивосток, «Медицина ДВ», 2007.-359 с. 7.

15. Leslie P. Gartner Histology & Embryology.Textbook of Histology, Elsevier Science. – 01.05.2020. – 704 с. ISBN: 0323672728; ISBN-13(EAN): 9780323672726.[https://www.logobook.ru/prod\\_show.php?object\\_uid=14844407&adv=10&gclid=EAIaIQobChMIgavItou88wIVSwKLCh1HLg87EAQYAiABEgK1H\\_D\\_BwE](https://www.logobook.ru/prod_show.php?object_uid=14844407&adv=10&gclid=EAIaIQobChMIgavItou88wIVSwKLCh1HLg87EAQYAiABEgK1H_D_BwE)

16. Гистология, эмбриология, цитология [Электронный ресурс] : [учеб. для высш. проф. образования] / [Ю. И. Афанасьев и др.] ; под ред.Ю. И. Афанасьева, Н. А.Юриной. – 6-е изд., перераб. и доп. –Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 804 с.

17. Гистология, цитология и эмбриология [Текст] : атлас : [учебное пособие для вузов] / В. Л. Быков, С. И. Юшканцева. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 293 с.

18. Цитология и общая гистология / Быков, В. Л. [Текст] : функциональная морфология клеток и тканей человека : [учебник для медицинских институтов] / В. Л. Быков. – Санкт-Петербург : СОТИС, 2016 – 2011. – 520 с.

19. Частная гистология человека [Текст] : (краткий обзорный курс) : учебник / В. Л.Быков. – Санкт-Петербург : СОТИС, 2016 -300 с.



20. Ross Michael H, Wojciech Pawlina. Histology: Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology, 8-ed. 2020.- 928 p. Lippincott Williams & Wilkins.  
[https://www.logobook.ru/prod\\_show.php?object\\_uid=14333896](https://www.logobook.ru/prod_show.php?object_uid=14333896)  
[https://www.logobook.ru/prod\\_show.php?object\\_uid=14333896](https://www.logobook.ru/prod_show.php?object_uid=14333896)
21. С. Зиматкин. Гистология, цитология и эмбриология. Краткий курс. ЛитРес: 11 сентября 2020. -305 с. ISBN: 978-985-06-3173-2  
<https://www.litres.ru/sergey-zimatkin/gistologiya-citologiya-i-embriologiya-kratkiy-kur-58139283/>
22. Цитология и общая гистология / Быков, В. Л. [Текст] : функциональная морфология клеток и тканей человека : [учебник для медицинских институтов] / В. Л. Быков. – Санкт-Петербург : СОТИС.- 2016 – 520 с.
23. Textbook of histology [Text] / L. P. Gartner. – 4 ed. – Philadelphia (PA) : Elsevier, 2017.- 592 с.  
[https://www.logobook.ru/prod\\_show.php?object\\_uid=12873579&adv=10&gclid=EA1aIQobChMIgavItou88wIVSwKLCh1HLg87EAQYASABEgLS0PD\\_BwE](https://www.logobook.ru/prod_show.php?object_uid=12873579&adv=10&gclid=EA1aIQobChMIgavItou88wIVSwKLCh1HLg87EAQYASABEgLS0PD_BwE)
24. Textbook of histology [Text] / L. P. Gartner. – 4 ed. – Philadelphia (PA) : Elsevier, 2017.- 592 с.  
[https://www.logobook.ru/prod\\_show.php?object\\_uid=12873579&adv=10&gclid=EA1aIQobChMIgavItou88wIVSwKLCh1HLg87EAQYASABEgLS0PD\\_BwE](https://www.logobook.ru/prod_show.php?object_uid=12873579&adv=10&gclid=EA1aIQobChMIgavItou88wIVSwKLCh1HLg87EAQYASABEgLS0PD_BwE)
25. С.М. Зиматкин. Гистология.- Видеолекции. 2018 г.-  
[https://www.youtube.com/playlist?list=PL1\\_TM5oTU-PLSv1CBk7572gS-DdKIdOQ](https://www.youtube.com/playlist?list=PL1_TM5oTU-PLSv1CBk7572gS-DdKIdOQ)
26. L. Mescher. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas.-2020. ISBN: 978-1-26-002618-4; ISBN: 978-1-26-002617-7.-
27. Гистология, цитология и эмбриология. Атлас [Электронный ресурс]: учебное пособие / Быков В.Л., Юшканцева С.И. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 296 с. <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970424377.html>
28. Гистология, цитология и эмбриология. Атлас [Электронный ресурс] : учебное пособие / Быков В.Л., Юшканцева С.И. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 296 с. <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970432013.html>
29. Гистология, цитология и эмбриология: атлас [Электронный ресурс] : учебное пособие / В.В. Гемонов, Э.А. Лаврова; под ред. члена-кор. РАМН С.Л. Кузнецова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. –168 с.  
<http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970426746.html>
30. С.М. Зиматкин. Гистология.- Видеолекции. 2018 г.-  
[https://www.youtube.com/playlist?list=PL1\\_TM5oTU-PLSv1CBk7572gS-DdKIdOQ](https://www.youtube.com/playlist?list=PL1_TM5oTU-PLSv1CBk7572gS-DdKIdOQ)
31. Самусев Р.П., Смирнов А.В. Атлас по гистологии и гистопатологии. – 2020.- 563 с. -ГЭОТАР-Медиа.

32. А.М. Коршунов, И.С. Преображенская «Программированная смерть клеток». Неврологический журнал, 1998. 16. Ярилин А.А. «Апоптоз и его место в иммунных процессах». Жур. Иммунология. №6. 1996.
33. Уманский С.Р. «Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы». Молекулярная биология. Т.30, №3. 1996.
34. Маянский А.Н. с соавт. «Апоптоз нейтрофилов». Иммунология. №6. 1999.
35. Погорелов В.М. с соавт. «Морфология апоптоза при нормальном и патологическом гемопоэзе». Гематология и трансфузиология. Т.40, №5. 1995.
36. М. Уикли «Электронная микроскопия для начинающих», 1978, М. «Мир»;
37. Н. Луппа «Гистохимия», 1979, «Мир»;
38. Г.А. Меркулов «Курс патогистологической техники», 1969.
39. Егорова О.В. Методическое пособие по работе на световых микроскопах. Электронное издательство «Аналитическая микроскопия» – 2013.- <https://yadi.sk/d/IVsDDU2s4CKaU>;
40. Войно-Ясенецкий М.В., Жаботинский К.М. Источники ошибок при морфологических исследованиях. – Л.: Медицина, 1970. – 319 с.
41. Световая микроскопия в биологии. Методы: Пер. с англ. / Под ред. А. Лейси.–М.: Мир, 1992. – 464 с. [Light microscopy in biology. A practical approach. / ed. by A. Lacey, 1989] <http://www.laboratorium.dp.ua/books/Lacey-LightMicroscopy.pdf>.
42. Атлас микрофотографий. А.Г. Гунин.- <http://www.openka.ru/> .
43. Ромейс Бенно. Микроскопическая техника. Издательство иностранной литературы. -2009.- 336 с.
44. Курс лекций по гистологии (П.А. Мотавкин), Владивосток, «Медицина ДВ», 2007.-359 с. 7. Цитология и общая гистология. Быков В.Л.- DJVU. Спб.: Сотис, 2002. – 520 с.
45. Микроскопическая техника. Руководство.- Саркисов Д. С., Перов Д. С. М., Медицина.-1996.- 544 с.. 5. Ромейс Бенно. Микроскопическая техника. Издательство иностранной литературы. -2009.- 336 с.
46. Цитология и общая гистология. Быков В.Л.- DJVU. Спб.: Сотис, 2021. – 624 с.
47. Ross Michael H, Wojciech Pawlina. Histology: Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology, 8-ed. 2020.- 928 p. Lippincott Williams & Wilkins. [https://www.logobook.ru/prod\\_show.php?object\\_uid=14333896](https://www.logobook.ru/prod_show.php?object_uid=14333896)  
[https://www.logobook.ru/prod\\_show.php?object\\_uid=14333896](https://www.logobook.ru/prod_show.php?object_uid=14333896)
48. Textbook of histology [Text] / L. P. Gartner. – 4 ed. – Philadelphia (PA) : Elsevier, 2017.- 592 с.

[https://www.logobook.ru/prod\\_show.php?object\\_uid=12873579&adv=10&gclid=EA1aIQobChMIgavItou88wIVSwKLCh1HLg87EAQYASABEgLS0PD\\_BwE](https://www.logobook.ru/prod_show.php?object_uid=12873579&adv=10&gclid=EA1aIQobChMIgavItou88wIVSwKLCh1HLg87EAQYASABEgLS0PD_BwE)

49. L. Mescher. Junqueiras Basic Histology Text and Atlas.-2020. ISBN: 978-1-26-002618-4; ISBN: 978-1-26-002617-7.-

50. Mescher. Junqueiras Basic Histology Text and Atlas.-2020. ISBN: 978-1-26-002618-4; ISBN: 978-1-26-002617-7.-

51. A.G. Sirak, E. I. Piskareva, M. A. Dolgashova, O. V. Bykhovets, O. V. Lyubanskaya, A. N. Mashchenko. The practical course for independent work histology, embryology, cytology for the foreign english-medium students of general medicine specialty: the Manual.– Stavropol: Publisher: Stavropol State Medical University, 2017 – 56 p.  
[https://stgm.ru/userfiles/depts/histology\\_embryology/Gistologiya\\_praktikum\\_angl..pdf](https://stgm.ru/userfiles/depts/histology_embryology/Gistologiya_praktikum_angl..pdf)

52. Color Atlas Of Cytology, Histology, And Microscopic Anatomy.-2012.-2021 p. <http://www.doko.vn/tai-lieu/pocket-atlas-of-cytology-1743259#!>

#### **Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»**

53. Учебное пособие для студентов Школы медицины Дальневосточного федерального университета «Цитология» [Электронный ресурс] / [сост. : Г.В. Рева, А.С. Новиков, И.В. Рева, Е.С. Можилевская]; под ред. Г.В. Рева.- Издательство ДВФУ. ФГАОУ ВО ДВФУ, департамент фундаментальной медицины. – Владивосток, Русский остров, ДВФУ. – 2022. – 142 с.

54. Учебное пособие для студентов Школы медицины Дальневосточного федерального университета по гистологии полости рта. [Электронный ресурс] / [сост. : Г.В. Рева, А.С. Новиков, И.В. Рева, Е.С. Можилевская]; под ред. Г.В. Рева.- Издательство ДВФУ. ФГАОУ ВО ДВФУ, департамент фундаментальной медицины. – Владивосток, Русский остров, ДВФУ. – 2022. – 504 с.

55. Данилов Р.К. Гистология, эмбриология, цитология. Атлас-справочник.- ISBN 978-5-9704-6335-2. -ГЭОТАР-Медиа.-2021.- 432 с.  
<https://medknigaservis.ru/product/gistologiya-embriologiya-tsitologiya-atlas-spravochnik/>

56. Банин В.В. Цитология. Функциональная ультраструктура клетки. Атлас : учебное пособие / В. В. Банин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 264 с. : ISBN 978-5-9704-3891-6. <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970438916.html>  
<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=25999821>

57. Усатине Р., Смит М., Мэйе Э., Шамли Х., Тайсингер Дж. Атлас-справочник врача общей практики. Междисциплинарный подход с основами семейной медицины. Том 1. 2014.- 624 С. – ISBN 978-5- 1839-017-7.  
<https://www.chitai->

[gorod.ru/catalog/book/906933/?yclid=5936553282257345204&utm\\_source=yandex&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Dinamicheskie RF Poisk&utm\\_term=&utm\\_content=k50id|01000000705949\\_Наука%20и%20техника|y|position|search|none|other3|gid|3234778483|ad|5498620623|b|5498620623||device|desktop|geo|Примор-ский%20край|11409|cid|33511392|main&k50id=01000000705949\\_Наука%20и%20техника](http://gorod.ru/catalog/book/906933/?yclid=5936553282257345204&utm_source=yandex&utm_medium=cpc&utm_campaign=Dinamicheskie_RF_Poisk&utm_term=&utm_content=k50id|01000000705949_Наука%20и%20техника|y|position|search|none|other3|gid|3234778483|ad|5498620623|b|5498620623||device|desktop|geo|Примор-ский%20край|11409|cid|33511392|main&k50id=01000000705949_Наука%20и%20техника)

58. Рабочая тетрадь для практических занятий по частной гистологии [Электронный ресурс] / [сост. : В. В. Глинкина, А.В. Быков, Л. А. Князева и др.] ; под ред. В. В. Глинкиной; РНИМУ им. Н. И. Пирогова, каф. гистологии, эмбриологии и цитологии лечеб. фак. – Москва : РНИМУ им. Н. И. Пирогова, 2018. – <http://rsmu.informsystema.ru/loginuser?login=Читатель&password=010101>

59. Учебное пособие к практическим занятиям по гистологии (пищеварительная система, дыхательная система, кожа и ее производные)

[Электронный ресурс] / [сост. : В. В. Глинкина, Л. А. Князева, Л. А., Быков и др.] ; под ред. В. В. Глинкиной; РНИМУ им. Н. И. Пирогова, каф. гистологии, эмбриологии и цитологии лечеб. фак. – Электрон. текст. дан. – Москва, 2019. – Adobe Acrobat Reader.

<http://rsmu.informsystema.ru/loginuser?login=Читатель&password=010101>

60. Электронное учебное пособие проф. А.Г. Гунина, содержит материалы по всем разделам гистологии <http://www.histol.chuvashia.com/edu/metod-ru.htm>

61. Американская национальная библиотека Национальных Институтов Здоровья (US National Library of Medicine National Institutes of Health) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

62. Виртуальная электронная микроскопия препаратов. <http://www.amc.anl.gov/>

63. Медицинская образовательная сеть Университета Лойола (Чикаго, США). База гистологических изображений по цитологии, общей и частной гистологии. [http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/histo\\_frames.html](http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/histo_frames.html)

64. Стадии внутриутробного развития человека с 13-го дня до 40 недель. <http://www.visembryo.com/baby/>

65. Сайт проф. Н.Н. Мушкамбарова <http://mushkambarov.narod.ru>

66. Гистология – мир! (Histology – World!) <http://www.histology-world.com>

67. Морфологи России – Web-сайт Всероссийского научного общества анатомов, гистологов и эмбриологов (ВНОАГЭ) <http://hist.yma.ac.ru/hist00.htm>

68. Гистология Мейера "Интерактивный онлайн атлас " (Meyer's Histology "Online interactive atlas") <http://meyerhistology.moodle.com.au>

69. Каталог Российской государственной библиотеки <http://aleph.rsl.ru>
70. Научная электронная библиотека <http://elibrary.ru/>
71. Научно-образовательный портал: <http://www.med-edu.ru/>
72. Интерактивная программа для самоподготовки и самоконтроля по курсам цитологии, общей и частной гистологии кафедры гистологии Ярославской гос. медицинской академии <http://hist.yma.ac.ru/test.html>
73. Каталог Российской государственной библиотеки <http://aleph.rsl.ru>
74. Научная библиотека ДВФУ <http://www.dvfu.ru/library/>
75. Гистология, эмбриология, цитология [Электронный ресурс] / Ю. И. Афанасьев; Н. А. Юрина; Я. А. Винников; А. И. Радостина; Ю. С. Ченцов" – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014."   
<http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970429525.html>
76. Гистология, эмбриология, цитология [Электронный ресурс] : учебник / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский и др. ; под ред. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. – 6-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019.- 804. С. <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970436639.html>
77. Гистология, цитология и эмбриология. Атлас [Электронный ресурс] : учебное пособие / Быков В.Л., Юшканцева С.И. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 296 с. <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970432013.html>
78. Гистология, эмбриология, цитология [Электронный ресурс]: учебник / Н. В. Бойчук, Р. Р. Исламов, Э. Г. Улумбеков, Ю. А. Челышев ; под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Челышева – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970437827.html>
79. Гистология и эмбриональное развитие органов полости рта человека [Электронный ресурс] / В.Л. Быков – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2021. – <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970430118.html>
80. Фото с сайта Molecular Expressions™, 10 gif-анимации – по материалам Nikon MicroscopyU с блога It's Okay To Be Smart). (Интернет ссылка :<http://www.microscopyu.com/moviegallery/c1si/mitosiseb3/index.html>)   
<http://kozlenkoa.narod.ru/mitoz.htm>
81. <http://www.itsokaytobesmart.com/post/37186578911/infinity-imagined-time-lapse-of-epithelial>
82. Апоптоз. Видеоанимация. <http://yandex.ru/yandsearch?text=%D0%B0%D0%BF%D0%BE%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%B7%20%D0%B2%20%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BC%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8&clid=1946579&lr=75&csg=1478%2C3191%2C18%2C8%2C0%2C1%2C0>
83. Учебное пособие для студентов Школы медицины Дальневосточного федерального университета «Цитология» [Электронный ресурс] / [сост. : Г.В.



Рева, А.С. Новиков, И.В. Рева, Е.С. Можилевская, Т. Ямамото]; под ред. Г.В. Рева.- Издательство ДВФУ. ФГАОУ ВО ДВФУ, департамент фундаментальной медицины. – Владивосток, Русский остров, ДВФУ. – 2022. – 389 с.

84. Учебно-методическое пособие для студентов Школы медицины Дальневосточного федерального университета по гистологии полости рта. [Электронный ресурс] / [сост. : Г.В. Рева, А.С. Новиков, И.В. Рева, Е.С. Можилевская, Т. Ямамото]; под ред. Г.В. Рева.- Издательство ДВФУ. ФГАОУ ВО ДВФУ, департамент фундаментальной медицины. – Владивосток, Русский остров, ДВФУ. – 2022. – 508 с.

85. Рабочая тетрадь для практических занятий по частной гистологии [Электронный ресурс] / [сост. : В. В. Глинкина, А.В. Быков, Л. А. Князева и др.] ; под ред. В. В. Глинкиной; РНИМУ им. Н. И. Пирогова, каф. гистологии, эмбриологии и цитологии лечеб. фак. -Москва : РНИМУ им. Н. И. Пирогова, 2018. – <http://rsmu.informsystema.ru/loginuser?login=Читатель&password=010101>

86. Учебное пособие к практическим занятиям по гистологии (пищеварительная система, дыхательная система, кожа и ее производные) [Электронный ресурс] / [сост. : В. В. Глинкина, Л. А. Князева, Л. А., Быков и др.] ; под ред. В. В. Глинкиной; РНИМУ им. Н. И. Пирогова, каф. гистологии, эмбриологии и цитологии лечеб. фак. – Электрон. текст. дан. – Москва, 2019. – Adobe Acrobat Reader. <http://rsmu.informsystema.ru/loginuser?login=Читатель&password=010101>

87. Электронное учебное пособие проф. А.Г. Гунина, содержит материалы по всем разделам гистологии <http://www.histol.chuvashia.com/edu/metod-ru.htm>

88. Американская национальная библиотека Национальных Институтов Здоровья (US National Library of Medicine National Institutes of Health) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

89. Виртуальная электронная микроскопия препаратов. <http://www.amc.anl.gov/>

90. Медицинская образовательная сеть Университета Лойола (Чикаго, США). База гистологических изображений по цитологии, общей и частной гистологии. [http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/histo\\_frames.html](http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/histo_frames.html)

91. Стадии внутриутробного развития человека с 13-го дня до 40 недель. <http://www.visembryo.com/baby/>

92. Сайт проф. Н.Н. Мушкамбарова <http://mushkambarov.narod.ru>

93. Гистология – мир! (Histology – World!) <http://www.histology-world.com>

94. Морфологи России – Web-сайт Всероссийского научного общества анатомов, гистологов и эмбриологов (ВНОАГЭ) <http://hist.yma.ac.ru/hist00.htm>

95. Гистология Мейера "Интерактивный онлайн атлас " (Meyer's Histology "Online interactive atlas") <http://meyerhistology.moodle.com.au>
96. Каталог Российской государственной библиотеки <http://aleph.rsl.ru>
97. Научная электронная библиотека <http://elibrary.ru/>
98. Научно-образовательный портал: <http://www.med-edu.ru/>
99. Интерактивная программа для самоподготовки и самоконтроля по курсам цитологии, общей и частной гистологии кафедры гистологии Ярославской гос. медицинской академии <http://hist.yma.ac.ru/test.html>
100. Каталог Российской государственной библиотеки <http://aleph.rsl.ru>
101. Научная библиотека ДВФУ <http://www.dvfu.ru/library/>
102. Егорова О.В. Методическое пособие по работе на световых микроскопах. Электронное издательство «Аналитическая микроскопия» – 2013.- <https://yadi.sk/d/1VsDDU2s4CKaU>;
103. Световая микроскопия в биологии. Методы: Пер. с англ. / Под ред. А. Лейси.–М.: Мир, 1992. – 464 с. [Light microscopy in biology. A practical approach. / ed. by A. Lacey, 1989] <http://www.laboratorium.dp.ua/books/Lacey-LightMicroscopy.pdf>.
104. Атлас микрофотографий. А.Г. Гунин.- <http://www.openka.ru/> . 10. Color Atlas Of Cytology, Histology, And Microscopic Anatomy.-2012.-221 p. <http://www.doko.vn/tai-lieu/pocket-atlas-of-cytology-1743259#>.
105. Гистология. А.Хэм, Д.Кормак, «Мир», т.1, 1983. 12. «Общая цитология» Ю.С.Ченцов, 1983. 13. «Молекулярная биология» Альбертс, М., «Мир», 1986, т.
106. «Биохимические основы патологических процессов». Под ред. Е.С.Северина. Москва «Медицина», 2000.
107. А.М. Коршунов, И.С. Преображенская «Программированная смерть клеток». Неврологический журнал, 1998. 16. Ярилин А.А. «Апоптоз и его место в иммунных процессах». Жур. Иммунология. №6. 1996.
108. Уманский С.Р. «Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы». Молекулярная биология. Т.30, №3. 1996.
109. Маянский А.Н. с соавт. «Апоптоз нейтрофилов». Иммунология. №6. 1999.
110. Погорелов В.М. с соавт. «Морфология апоптоза при нормальном и патологическом гемопоэзе». Гематология и трансфузиология. Т.40, №5. 1995.
111. Ross, Anna E. 2019. BIOL 414 Animal Histology Lecture and Laboratory Course Supplement, 2019. <http://facstaff.cbu.edu/aross/histol.htm>
112. Pawlina, Wojciech. 2016. Histology A Text and Atlas.
113. Wojciech Pawlina and 1 more Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology.

114. Histology\_ A Text and Atlas\_ With Correlated Cell and Molecular Biology\_ 9781496383426\_ Medicine & Health Science Books @ Amazon.com

115. HISTOLOGY COURSE ONLINE. Related Search  
<https://www.coursef.com/histology-course-online> 2021.

116. Histology – Complete Lecture Notes. Full lecture notes from Autumn 2019. University of Technology Sydney. Course Histology (091500 ) Academic year 2019/2020. <https://www.studocu.com/en-au/document/university-of-technology-sydney/histology/histology-complete-lecture-notes/5026076>

117. Histology Complete Lecture Notes. Full lecture notes from Autumn 2019. University of Technology Sydney. Course Histology (091500) Academic year 2019/2020. <https://www.studocu.com/en-au/document/university-of-technology-sydney/histology/histology-complete-lecture-notes/5026076>