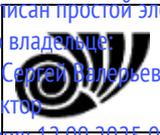


Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич
Должность: Ректор
Дата подписания: 12.09.2025 09:48:47
Уникальный программный ключ:
04c19ed8bfb98f3b6cb77a486b9a8788b8322323



МИНОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИИ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)	
Фонд оценочных средств по дисциплине «Гистохимические методы исследования» по направлению подготовки 06.03.01 «Биология» направленности «Биология» ФГБОУ ВО «ЧелГУ»	стр. 1

**Фонд оценочных средств
промежуточной аттестации
по дисциплине**

Гистохимические методы исследования

Направление подготовки
06.03.01 Биология

Направленность
Биология

Присваиваемая квалификация
Бакалавр

Форма обучения
Очная

Год набора: 2025

Челябинск, 2025 г.

1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Направление подготовки: **06.03.01 Биология**

Направленность (профили): Гистология и гистологическая техника.

Дисциплина: **Гистохимические методы исследования**

Семестры изучения: 7

Форма промежуточной аттестации: зачет

2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

2.1. Компетенции, закреплённые за дисциплиной

Изучение дисциплины «Гистохимические методы исследования» направлено на формирование следующих компетенций и индикаторов:

Коды компетенции и (по ФГОС)	Содержание компетенций согласно ФГОС	Коды и содержание индикаторов	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
1	2	3	4
УК-2	Способен определять круг задач в рамках поставленной цели и выбирать оптимальные способы их решения, исходя из действующих правовых норм, имеющихся ресурсов и ограничений.	УК-2.2. Выявляет и анализирует различные способы решения задач в рамках цели проекта и аргументирует их выбор.	<p>Знать: Для достижения УК-2.2 знать: значение и содержание каждого этапа гистохимической реакции. Для достижения УК-2.2 знать: основы гистохимии и энзимохимии.</p> <p>Уметь: Для достижения УК-2.2 уметь: требования, предъявляемые к гистологическому срезу, подвергающемуся гистохимическому исследованию. Для достижения УК-2.2 уметь: излагать и критически анализировать получаемую информацию в ходе проведения гистохимического исследования материала.</p> <p>Владеть: Для достижения УК-2.2 владеть: методами поиска и сбора доступной информации, представленной в данных различной природы. Для достижения УК-2.2 владеть: навыками работы с материалами, реактивами и оборудованием, предназначенными для проведения гистохимических реакций.</p>

ПК-2	Способен применять знания и методы различных отраслей биологической науки для решения профессиональных задач при изучении биологических систем разного уровня организации	ПК-2.3 Владеть: современными методами исследования для решения профессиональных задач при изучении биологических систем разного уровня организации.	Знать: Для достижения ПК-2.3 знать: фундаментальные основы различных отраслей биологической науки. Уметь: Для достижения ПК-2.3 уметь: использовать знания основ строения и функционирования биологических систем различного уровня организации при решении профессиональных задач. Владеть: Для достижения ПК-2.3 владеть: современными методами исследования для решения профессиональных задач при изучении биологических систем разного уровня организации.
------	---	---	---

3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

3.1 Виды оценочных средств

№ п/п	Код компетенции/планируемые результаты обучения	Контролируемые темы/разделы	Наименование оценочного средства для текущего контроля	Наименован ие оценочного средства на промежуточ ной аттестации № задания
1.	<p>УК-2</p> <p>Знать: Для достижения УК-2.2 знать: значение и содержание каждого этапа гистохимической реакции. Для достижения УК-2.2 знать: основы гистохимии и энзимоцитохимии.</p> <p>Уметь: Для достижения УК-2.2 уметь: требования, предъявляемые к гистологическому срезу, подвергающемуся гистохимическому исследованию.</p> <p>Для достижения УК-2.2 уметь: излагать и критически анализировать получаемую информацию в ходе проведения гистохимического исследования материала.</p> <p>Владеть: Для достижения УК-2.2 владеть: методами поиска и сбора доступной информации, представленной в данных различной природы. Для достижения УК-2.2 владеть: навыками работы с материалами, реактивами и оборудованием, предназначенными для</p>	<p>1.Криостат.</p> <p>2.Основы гистохимических методов исследования белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот, основы энзимогистохимии.</p> <p>3.Методы исследования макрофагов, тучных клеток.</p>	<p>Опрос- демонстрация, опрос, контрольная работа.</p>	<p>Опрос по билетам к зачету № 1- 15.</p>

	проведения гистохимических реакций.			
2.	<p>ПК-2 Знать: Для достижения ПК-2.3 знать: фундаментальные основы различных отраслей биологической науки. Уметь: Для достижения ПК-2.3 уметь: использовать знания основ строения и функционирования биологических систем различного уровня организации при решении профессиональных задач. Владеть: Для достижения ПК-2.3 владеть: современными методами исследования для решения профессиональных задач при изучении биологических систем разного уровня организации.</p>	<p>1.Криостат. 2.Основы гистохимических методов исследования белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот, основы энзимогистохимии. 3.Методы исследования макрофагов, тучных клеток.</p>	Слайд-сообщение.	Опрос по билетам № 1-15.

Примечание: типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего контроля представлены в рабочей программе дисциплины (модуля). Полные комплекты оценочных средств и контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре.

3.2 Содержание оценочных средств

Оценочные средства промежуточной аттестации по дисциплине «Гистохимические методы исследования» представлены вопросами к зачету по дисциплине.

Вопросы к зачету по дисциплине:

1. Предмет и задачи гистохимии.
2. Основные методы гистохимии.
3. Современное развитие гистохимии, основные направления развития.
4. Значение гистохимии для фундаментальных и прикладных исследований в биологии и медицине.
5. Особенности приготовления препарата для гистохимического исследования.
6. Оценка результатов гистохимического исследования.
7. Контрольные реакции.
8. Ошибки при постановке гистохимических реакций.
9. Устройство криостата, принцип работы, настройка и подготовка к работе.
10. Подготовка материала к изготовлению криостатных срезов.
11. Методика изготовления криостатных срезов.
12. Ошибки и дефекты криостатных срезов, их коррекция и устранение.
13. Особенности окраски криостатных срезов.
14. Понятие о включениях, их разновидности.
15. Характеристика трофических включений.
16. Белки: строение, разновидности, функции.
17. Принципы выявления белков.
18. Понятие о контрольных реакциях при выявлении белков.
19. Способы определения аминокислот, основных и суммарных белков.
20. Сущность гистохимических реакций, техника постановки. Реакции гистохимического контроля при выявлении белков.
21. Углеводы: строение, разновидности.
22. Принципы выявления углеводов.
23. Понятие о контрольных реакциях при выявлении углеводов.
24. Химические основы ШИК - реакции.
25. Особенности выявления гликогена. В
26. Возможности дифференцированного выявления ГАГ.
27. Виды нуклеиновых кислот, локализация в клетке.
28. Роль нуклеиновых кислот в хранении и реализации наследственной информации.
29. Пуриновые или пиримидиновые основания, способы выявления.
30. Углеводный компонент нуклеиновых кислот, способы определения.

31. Определение углеводного компонента по образующимся в результате кислотного гидролиза альдегидным группам с помощью реактива Шиффа или его аналогов.
32. Выявление фосфорной кислоты по сродству к основным красителям.
33. Химические и физические свойства липидов.
34. Классификация липидов.
35. Локализация липидов в клетках и тканях.
36. Методы фиксации липидов.
37. Принципы, лежащие в основе окраски липидов.
38. Сложные липиды и жироподобные вещества. Общая характеристика.
39. Общие принципы выявления сложных липидов.
40. Основные гистохимические методы выявления сложных липидов.
41. Общая характеристика ферментов.
42. Классификация ферментов.
43. Задачи и цели энзимогистохимии.
44. Специфические особенности гистохимического выявления ферментов.
45. Разновидности гистохимических реакций определения ферментативной активности.
46. Реакции осаждения ионами металлов.
47. Окислительно-восстановительные реакции.
48. Индигогенные методы.
49. Реакции азосочетания.
50. Реакции со вспомогательными ферментами.
51. Реакции синтеза.
52. Артефакты и контрольные реакции.
53. Основные этапы подготовки тканей для гистохимического выявления ферментов. Методы оценки результатов гистохимического исследования.
54. Классификация гидролитических ферментов, расщепляющих органические фосфатные эфиры.
55. Реакции, катализируемые фосфатазами. Специфические особенности гистохимического выявления фосфатаз.
56. Разновидности гистохимических реакций определения ферментативной активности фосфатаз. Выявление кислой фосфатазы по Гомори. Выявление щелочной фосфатазы по Гомори.
57. Выявление щелочной фосфатазы по Берстону. Методы выявления азокрасителями.
58. Реакции, катализируемые дегидрогеназами. Специфические особенности гистохимического выявления дегидрогеназ.
59. Разновидности гистохимических реакций определения ферментативной активности дегидрогеназ.
60. Тетразолиевые методы выявления дегидрогеназ.
61. Макрофаги: источник развития, строение, функции.
62. Понятие о системе мононуклеарных фагоцитов: разновидности макрофагов, принципы создания СМФ.
63. Принципы цитологического исследования СМФ.
64. Оценка функциональной активности макрофагов: миграция и фагоцитоз.
65. Источник развития тучных клеток.

66. Распространенность тучных клеток. Морфология тучных клеток.
67. Сравнительная характеристика тучных клеток и базофилов крови.
68. Разновидности тучных клеток: особенности соединительно-тканых тучных клеток и тучных клеток слизистых оболочек.
69. Гранулы тучных клеток: разновидности, функциональное значение БАВ, входящих в их состав.
70. Функции тучных клеток: участие в свертываемости крови, роль в микроциркуляции, участие в аллергических реакциях, значение в репарации тканей, участие в иммунных реакциях.
71. Оценка функциональной активности тучных клеток: активация, миграция и хемотаксис, фагоцитоз, дегрануляция.

Примеры билетов к зачету:

Билет № 1

1. Принцип подготовки материала для гистохимического исследования. Фиксация материала для гистохимического исследования: разновидности, требования.
2. Белки: разновидности, функции, распространенность в организме. Методы выявления суммарных, основных и кислых белков.

1 вопрос

Целью фиксации биологического материала для гистохимического анализа является перевод живого вещества из лабильного состояния в стабильное, т.е. прекращение процессов аутолиза и стабилизация веществ и структур клетки в такой мере, при которой их локализация, целостность и взаимное расположение практически не изменяются при последующем обезвоживании, заливке в парафин или в смолу, приготовлении срезов, а также под воздействием пучка электронов, если проводится ультрацитохимический анализ. Для достижения этой цели возможны три подхода: высушивание, замораживание и химическая фиксация.

Наиболее часто как в гистологической, так и гистохимической практике используют метод химической фиксации. На его результаты влияют время, прошедшее после взятия материала, продолжительность фиксации, рН и изотоничность фиксирующей среды, температура и химические свойства выбранного фиксирующего реагента. Очень важное значение имеет время, прошедшее от прижизненного взятия материала из организма до начала фиксации. Этот срок должен быть максимально сокращен, желательно до нескольких минут, хотя неплохая морфологическая сохранность, достаточная для идентификации ткани, клеток и веществ с целью патоморфологической диагностики, может быть обеспечена при фиксации материала через 30-90 мин после операции.

Температура фиксирующего раствора для гистохимических целей в большинстве случаев устанавливается от 0 до 4 °С для замедления аутолитических процессов и для снижения скорости возможной диффузии исследуемого вещества. Фиксация на холоду особенно рекомендуется для энзимогистохимических и ультрацитохимических исследований.

В химической фиксации для гистохимических целей используют в первую очередь альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид и др.), тетраоксид осмия, хромовую

кислоту и ее соли, спирты (этанол, метанол и др.) ацетон, соли ртути (например сулема), уранилацетат и кислоты (например, уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, азотная и др.).

2 вопрос

Белки — природные полимеры аминокислот, входящие в состав подавляющего большинства клеточных и тканевых структур. С ним связаны пластические, энергетические, транспортные и ферментные процессы. Поэтому гистохимическое их выявление имеет важное значение для характеристики изменений, происходящих в клетках и тканях (как в норме, так и в патологии).

Белки принимают участие в построении практически всех структур клеток и тканей. Для гистохимии представляет интерес не подтверждение наличия белков в тех или иных клеточных и тканевых структурах, а оценка его содержания или установление класса белка.

Гистохимические методы выявления белка берут начало от классических реакций аналитической, органической и биологической химии. К ним относятся: реакция Миллона на тирозин; диазониевая реакция на тирозин, триптофан и гистидин; ксантопротеиновая реакция на фенольные производные; реакция Сакагуши на аргинин; нитропруссидная реакция на сульфгидрильные группы; нингидриновая реакция на свободные ИН-группы; реакция сулема — бромфеноловый синий; реакция динитрофторбензола с ароматической группой тирозина по Сэн-геру и др.

Строго говоря, эти реакции позволяют в большей или меньшей мере установить наличие только определенных аминокислот, однако положительную реакцию можно также считать доказательством присутствия белка в целом, поскольку в гистологических и цитологических препаратах свободные аминокислоты не встречаются.

Билет № 2

1. Принцип приготовления свежемороженых срезов для гистохимических исследований (достоинства и недостатки). Криомикротомия.
2. Химические и физические свойства липидов. Классификация липидов. Локализация липидов в клетках и тканях. Принципы, лежащие в основе окраски липидов.

1 вопрос

Криомикротомия (криотомия) — процесс изготовления гистологических срезов из замороженного материала с использованием криостата. К основным преимуществам данного варианта исследования можно отнести:

1. Позволяет быстро и точно произвести исследование материала (эксперс-диагностика в клинической практике);
2. Позволяет максимально сохранить в тканях и клетках вещества, хорошо растворимые в органических растворителях (в частности, большинство липидов);
3. Позволяет производить гисто- и цитохимическую оценку веществ, которые

быстро разрушаются в тканях после отделения последних от живого организма (многие ферменты).

Среди основных недостатков можно выделить следующие:

- 1. Срезы, как правило, являются достаточно толстыми;*
- 2. Из некоторых органов и тканей, отдельные микроструктуры которых рыхло соединены между собой, нельзя получить замороженные срезы;*
- 3. Отсутствие возможности изготовления среза из сильно обводненной ткани;*
- 4. Острая необходимость предварительного включения криостата.*

2 вопрос

Собирательный термин «липиды» охватывает жиры (т. е. триглицериды) и жироподобные вещества растительного и животного происхождения. Это преимущественно неполярные соединения, основным компонентом которых являются жирные кислоты. Липиды нерастворимы или плохо растворимы в воде, но хорошо растворяются в типичных жирорастворителях: бензине, хлороформе, четыреххлористом углероде, ацетоне, эфире, петролейном эфире, горячем спирте и т. п. Не все липиды растворимы в указанных растворителях одинаково, на этом основаны дифференциальная экстракция липидов и выявление их с помощью жирорастворимых красителей.

С учетом гистохимических свойств и химической структуры липиды делят на простые (нейтральные жиры, воски, стериды) и сложные (фосфолипиды, цереброзиды, ганглиозиды, сульфолипиды).

Гистохимическое выявление липидов возможно с помощью физических и химических методов. К физическим относятся методы экстракции, поляризационная микроскопия и окрашивание жирорастворимыми красителями, к химическим — подавляющее большинство гистохимических методов выявления липидов, направленных главным образом на определение активных функциональных групп.

Билет № 3

- 1. Энзимогистохимические исследования: понятие, специфика, требования, предъявляемые к постановке энзимогистохимических реакций.*
- 2. Значение, строение и локализация нуклеиновых кислот в клетке. Особенности реакций нуклеиновых кислот с различными химическими соединениями.*

1 вопрос

Энзимогистохимия, или гистохимия ферментов. Ферменты — белковые вещества, выполняющие роль биологических катализаторов. Чрезвычайно важны для обеспечения обменных процессов в живых организмах. Они играют основную роль в обеспечении и регуловке биохимических реакций в живых структурах, в силу чего наиболее ранние этапы нарушения обмена, ведущие в дальнейшем к морфологическим изменениям микроструктур, обнаруживаемых обычными гистологическими методами, происходят преимущественно в сфере деятельности ферментов. Поэтому естественно то большое внимание, которое уделяют исследователи изучению состояния отдельных ферментов и

ферментных систем при нормальных и патологических процессах в организме. Ферменты обладают строгой специфичностью к веществам, на которые они воздействуют (субстрат), и проявляют активность при определенных условиях температуры и реакции (рН) среды (нейтральная, кислая, щелочная).

Гистохимическое исследование ферментов имеет свои специфические особенности:

- а) в ходе гистохимической реакции выявляется не сам фермент, а продукт, образующийся в результате взаимодействия фермента с субстратом (веществом, на которое воздействует данный фермент);*
- б) для определения истинной локализации фермента в микроструктурах необходимо, чтобы продукт его деятельности был тут же осажден в виде нерастворимого соединения, иначе в результате диффузии будет получена ложная локализация. В тех случаях, когда осадок бесцветный, его необходимо превратить в окрашенный продукт, видимый в микроскоп. Схематично всю реакцию можно представить в следующем виде:*

Фермент в клетке + субстрат → неокрашенный продукт реакции

Осадитель + проявитель → окрашенный нерастворимый продукт реакции

В конечном итоге мы получаем характеристику активности исследуемого фермента. Чем большее количество продукта образуется в результате взаимодействия фермента и субстрата, тем менее окраска структур и, следовательно, выше активность фермента. Наоборот, чем слабее окраска, тем активность фермента ниже.

Из сказанного видно, сколь сложен процесс гистохимического определения активности ферментов. Это находит свое отражение и в методических приемах, принципы которых необходимо знать и постоянно помнить в процессе работы.

Так, чувствительность ферментов к изменениям температуры и рН среды приводит к значительной потере их активности при подготовке тканей к заливке в парафин. Хотя в ряде руководств имеются рекомендации по выявлению некоторых ферментов в парафиновых срезах, эти методы не находят широкого применения, так как не являются надежными, особенно для органов и тканей, в которых активность исследуемых ферментов невысока. Наилучшие результаты могут быть достигнуты при изучении срезов нефиксированной ткани, полученных в специальном приборе — криостате, а для ряда ферментов — и срезов, приготовленных с помощью обычного замораживающего микротомы из тканей, предварительно фиксированных охлажденными фиксирующими жидкостями (формалин, ацетон). Существуют и более сложные способы подготовки блоков из нефиксированной ткани с применением специальной аппаратуры.

Специфические особенности и свойства ферментов предъявляют высокие требования к условиям проведения гистохимической реакции, в первую очередь к составлению среды для инкубации срезов. Обязательными ингредиентами последней являются субстрат (специфичный для данного фермента), буферный раствор (обеспечивающий определенную реакцию среды), вещества, препятствующие диффузии продукта реакции. По мере надобности в инкубационную среду вводят и другие компоненты, стимулирующие ход реакции (активирующие деятельность фермента, блокирующие отдельные звенья химических процессов и др.).

2 вопрос

Нуклеиновые кислоты (высокомолекулярные соединения сложного химического состава) играют чрезвычайно важную роль в обеспечении жизнедеятельности любой животной клетки. Рибонуклеиновая кислота (РНК) осуществляет синтез белков, а дезоксирибонуклеиновая (ДНК) — хранение и передачу наследственных признаков. Первая содержится в цитоплазме и ядрышках, вторая — в хроматине ядер. Столь важная роль нуклеиновых кислот является причиной большого интереса к изучению их содержания и распространения в органах и тканях организма. Существует несколько способов гистохимического выявления нуклеиновых кислот, но наибольшее распространение получил метод Браше (для выявления РНК) и метод Фельгена (для выявления ДНК).

- 1. Метод Браше: окраска пиронином-метиловым зеленым. Сущность метода заключается в избирательном присоединении основных красителей к нуклеиновым кислотам – пиронина к РНК (дает красное окрашивание), метилового зеленого к ДНК (дает зеленое окрашивание). Для контроля РНК перед окрашиванием требуется обработка препаратов рибонуклеазой.*
- 2. Метод Фельгена: гидролиз в 1 N растворе HCl для освобождения альдегидных группировок дезоксирибозы (составной части молекулы ДНК). Обработка реактивом Шиффа – фуксинсернистой кислотой – бесцветным соединением, обладающим высокой степенью чувствительности к альдегидам. Соединяясь с фуксинсернистой кислотой, альдегиды переводят ее в осединение, окрашенное в яркий красно-фиолетовый цвет. Реакция специфичная.*

Билет № 4

- 1. Гистохимическое выявление веществ: общие принципы, значение, ошибки, способы оценки, понятие о контрольных реакциях при проведении гистохимических исследований.*
- 2. Общая характеристика и методы выявления щелочной и кислой фосфатазы.*

1 вопрос

Длительное время для изучения химического состава клеток и тканей пользовались исключительно классическими биохимическими методами, в основе которых лежит суммарное определение химических веществ в размельченной ткани (гомогенате). Однако, несмотря на свои положительные качества, эти методы не обеспечивали полного представления о локализации тех или иных химических веществ в различных структурных компонентах клеток и тканей. Поиски методов, с помощью которых можно было бы определять локализацию химических веществ в целостных микроструктурах органов и тканей, привели к созданию гистохимического метода, объединяющего в себе гистологический и биохимический методы.

При гистохимических реакциях неорганические и органические вещества, входящие в состав клеток, вступают в химическую реакцию с различными реактивами (красителями) и образуют окрашенные продукты реакции. По степени интенсивности этих продуктов можно до некоторой степени судить и о количественном содержании

химического вещества в той или иной структуре.

В основе большинства гистохимических реакций лежат общие принципы.

- 1. Определенные химические группировки окрашиваются тем или иным красителем. Например, фосфатные группы РНК образуют с основными красителями (пиронин, толуидиновый синий и др.) солеобразные окрашенные соединения*
- 2. Краситель растворяется в определенном субстрате, входящем в состав клеточных структур. Например, окраска жировых включений в клетке основана на растворении Судана в жировой капле.*
- 3. Некоторые химические компоненты клеток, такие, как ДНК, полисахариды, неспособны реагировать с красителями. В таких случаях прибегают к превращению их химических группировок в реакционно-активное состояние (гидролиз ДНК хлористоводородной кислотой, окисление полисахаридов йодной кислотой). При этом освобождаются или создаются вновь химические группировки, которые способны реагировать с соответствующими реактивами, в результате чего образуется окрашенный продукт реакции.*
- 4. При выявлении локализации некоторых компонентов клетки прибегают к многоступенчатым промежуточным реакциям и переводу неокрашенного продукта реакции в окрашенный. Например, так поступают при гистохимическом окрашивании ферментов.*
- 5. Часто приходится прибегать к постановке контрольных реакций – реакций, в которых исследуемое вещество заведомо удалено из среза.*

Новый метод получил широкое распространение в исследовательской практике. В настоящее время ни одна морфологическая лаборатория не обходится без применения гистохимических методик. Однако успешное владение ими требует усвоения определенных навыков и соблюдения ряда условий, так как в отличие от гистологических методик, носящих большей частью эмпирический характер, гистохимические основаны на определенных химических механизмах и обладают строгой специфичностью. Отсюда главное требование — особая точность и тщательность в работе. Критерием в оценке результатов гистохимической реакции является не только локализация химических веществ, но и интенсивность окраски исследуемых компонентов клеток и тканей, так как именно она свидетельствует о концентрации выявляемых веществ. Если при гистологической обработке материала возможны некоторые отклонения в ходе окрашивания препарата, то приемы, используемые для подготовки материала и проведения гистохимических реакций, должны тщательно соблюдаться, ибо отклонения на любом этапе могут изменить ход реакции и в конечном итоге привести к неправильной оценке препарата.

Для создания надлежащих условий протекания химических реакций особое внимание нужно уделить приготовлению рабочих растворов, а также чистоте применяемой посуды и стекол, качеству реактивов и т. д.

Стандартным способом оценки гистохимической реакции является полуколичественный подсчет интенсивности окрашивания. В настоящее

время гистохимия перешла на количественный уровень исследования с применением специальных приборов (цитоспектрофотометров), позволяющих довольно точно определять количественную характеристику интенсивности окраски (продукта реакции), что особенно важно для оценки состояния метаболизма в исследуемых органах, тканях и отдельных клетках. Это еще в большей степени предъявляет повышенные требования к качеству проведения гистохимических реакций и соблюдению строгой стандартизации обработки сравниваемых объектов на всех этапах. Именно в этих целях в первую очередь применяют совмещение сравниваемых образцов в одном блоке с последующим получением срезов одинаковой толщины на одном стекле. Когда это сделать невозможно, необходимо в ходе резки располагать разные срезы на одном предметном стекле. При любом способе совмещения сравниваемые срезы следует подвергать всем этапам гистохимических реакций одновременно, используя одни и те же порции реактивов.

2 вопрос

Фосфатаза кислая – фермент, который катализирует гидролиз ортофосфорных моноэфиров с отщеплением фосфатной группы, проявляющий оптимальную активность в кислой среде. Кислая фосфатаза находится в клетках различных тканей в лизосомах и за их пределами. Щелочная фосфатаза – фермент, содержащийся практически во всех тканях организма, с преимущественной локализацией в печени, костях и плаценте. Фосфатазы в клетках участвуют в реакциях отщепления остатка фосфорной кислоты от ее органических соединений.

Выявление кислой фосфатазы по Гомори.

Применяют замороженные срезы толщиной 10–15 мкм из нефиксированной, фиксированной в охлажденном растворе ацетона или 10% нейтрального формалина (4–24 ч при 0–4°C) ткани, наклеенные на предметные стекла или свободноплавающие.

1. Поместить срезы в инкубационную среду и поставить в термостат при 37°C на время от 30 мин до 6 ч (в зависимости от исследуемых органов).
2. Ополоснуть в дистиллированной воде.
3. Обработать сульфидом аммония в течение 0.5–1 мин (срез принимает темно-коричневую окраску).
4. Промыть в дистиллированной воде (если нужно, докрасить) и заключить в глицерин-желатин.

Результат: наличие черно-коричневого осадка сульфида свинца указывает на присутствие в тканях фермента.

Выявление щелочной фосфатазы по Гомори (фиксация и приготовление срезов, как и для кислой фосфатазы).

1. Поместить срезы в инкубационную среду и поставить в термостат при 37°C от 30 мин до 4 ч.
2. Промыть в водопроводной воде и в течение 3–5 мин обработать в 2% растворе хлорида кобальта (CoCl₂).
3. Ополоснуть в дистиллированной воде и обработать с сульфидом аммония (до почернения среза).

4. Промыть в нескольких порциях дистиллированной воды (если нужно докрасить), обезводить, просветлить и заключить в бальзам.

Результат: черные отложения сульфида кобальта указывают локализацию ферментативной активности.

Приведенные методы длительное время считались наиболее предпочтительными. Однако в последние годы они вытесняются методами, основанными на применении азокрасителей (методом азосочетания), поскольку методы Гомори недостаточно специфичны, осадок грубый, искажающий реальную картину, особенно при выявлении щелочной фосфатазы.

Билет № 5

1. Макрофаги: источник развития, строение и функции. Понятие о системе мононуклеарных фагоцитов. Принципы цитологического исследования макрофагов.
2. Белки: разновидности, функции, распространенность в организме. Методы выявления суммарных, основных и кислых белков.

1 вопрос

Макрофаги – это гетерогенная клеточная популяция, источником развития которой являются моноциты периферической крови. Макрофаг имеет неправильную, звездчатую, многоотростчатую форму, складки и микроворсинки на поверхности клеток, обилие эндоцитозных микровезикул, первичных и вторичных лизосом. Округлое или эллипсоидное ядро расположено центрально, гетерохроматин локализован под ядерной оболочкой. Структурные особенности клетки во многом зависят от ее органной и тканевой принадлежности, а также от функционального статуса. Так, для клеток Купфера характерен гликокаликс, альвеолярные макрофаги содержат ламеллярные (сурфактантные) тельца, хорошо развитый комплекс Гольджи, шероховатый эндоплазматический ретикулум и множество митохондрий, в то время как в клетках микроглии митохондрии немногочисленны. В цитоплазме перитонеальных и альвеолярных макрофагов присутствует большое количество липидных телец, содержащих субстраты и ферменты генерации простагландинов. Адгезирующие и движущиеся макрофаги формируют короткоживущие, содержащие актин структуры – подсосмы – в виде плотной центральной части с радиально отходящими от них микрофиламентами. Макрофаги фагоцитируют чужеродный материал и клеточно-тканевый детрит, стимулируют и регулируют иммунный ответ, индуцируют воспалительную реакцию, участвуют в репаративных процессах и обмене компонентов внеклеточного матрикса. Многообразие осуществляемых функций объясняет экспрессию этими клетками большого числа рецепторов, связанных с плазматической мембраной, внутриклеточных и секретруемых.

Макрофаги входят в систему мононуклеарных фагоцитов. Система мононуклеарных фагоцитов это физиологическая защитная система клеток, обладающих способностью поглощать и переваривать чужеродный материал. Клетки, входящие в состав этой системы, имеют общее происхождение, характеризуются морфологическим

и функциональным сходством и присутствуют во всех тканях организма. Критериями принадлежности к этой системе считают способность к активному пиноцитозу и иммунному фагоцитозу, способность прилипать к стеклянным поверхностям и происхождение из промоноцитов костного мозга. При цитологическом исследовании макрофагов первым и важнейшим этапом становится их правильное выделение из материала. Методика выделения может значительно варьироваться исходя из типа изучаемого органа. В последующем необходимо изготовить мазки, окрасить их методикой, позволяющей оценить тот или иной компонент клетки (например, окраска на пероксидазу, активность лизосом и т.д.). Полученные результаты оцениваются полуколичественным методом, с вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Приступая к микроскопии, в каждом отдельном мазке при обзорном просмотре выбирают эталоны – клетки, содержащие исследуемое вещество. Отсутствие окраски цитоплазмы принимается за нулевую степень. Наличие в цитоплазме небольшого окрашенного участка, составляющего 1/4 часть всей цитоплазмы, соответствует интенсивности реакции 1-й степени (А). Окрашивание 8/10 цитоплазмы принимается за 2-ю степень насыщения (В). При 3-й степени интенсивности реакции исследуемое вещество заполняет всю цитоплазму и даже выявляется на ядре. Затем, как при подсчете лейкоцитарной формулы, в разных участках мазка подсчитывают, не пропуская, 100 однотипных клеток и рассчитывают процентное содержание клеточных элементов с различной интенсивностью реакции. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) вычисляется по формуле (по Карлов):

$$\text{СЦК} = 3\text{С} + 2\text{В} + \text{А}$$

При вычислении показателя активности, клетки с интенсивностью 0 исключаются; к проценту клеток с интенсивностью 1 (А) прибавляется процент клеток с интенсивностью 2 (В), умноженный на коэффициент 2 и количество клеток с интенсивностью 3 (С), умноженное на коэффициент 3. Показатель активности в условных единицах от 0 до 300, СЦК 0–3%.

2 вопрос

Белки — природные полимеры аминокислот, входящие в состав подавляющего большинства клеточных и тканевых структур. С ним связаны пластические, энергетические, транспортные и ферментные процессы. Поэтому гистохимическое их выявление имеет важное значение для характеристики изменений, происходящих в клетках и тканях (как в норме, так и в патологии).

Белки принимают участие в построении практически всех структур клеток и тканей. Для гистохимии представляет интерес не подтверждение наличия белков в тех или иных клеточных и тканевых структурах, а оценка его содержания или установление класса белка.

Гистохимические методы выявления белка берут начало от классических реакций аналитической, органической и биологической химии. К ним относятся: реакция Миллона на тирозин; диазониевая реакция на тирозин, триптофан и гистидин; ксантопротеиновая реакция на фенольные производные; реакция Сакагуши на аргинин;

нитропруссидная реакция на сульфгидрильные группы; нингидриновая реакция на свободные ИН-группы; реакция сулема — бромфеноловый синий; реакция динитрофторбензола с ароматической группой тирозина по Сэн-геру и др.

Строго говоря, эти реакции позволяют в большей или меньшей мере установить наличие только определенных аминокислот, однако положительную реакцию можно также считать доказательством присутствия белка в целом, поскольку в гистологических и цитологических препаратах свободные аминокислоты не встречаются.

Билет № 6

1. Энзимогистохимические исследования: понятие, специфика, требования, предъявляемые к постановке энзимогистохимических реакций.
2. Значение углеводов в клетке. Принципы гистохимических реакций на выявление углеводов. Химические основы ШИК – реакции. Особенности выявления гликогена.

1 вопрос

Энзимогистохимия, или гистохимия ферментов. Ферменты — белковые вещества, выполняющие роль биологических катализаторов. Чрезвычайно важны для обеспечения обменных процессов в живых организмах. Они играют основную роль в обеспечении и регуляции биохимических реакций в живых структурах, в силу чего наиболее ранние этапы нарушения обмена, ведущие в дальнейшем к морфологическим изменениям микроструктур, обнаруживаемых обычными гистологическими методами, происходят преимущественно в сфере деятельности ферментов. Поэтому естественно то большое внимание, которое уделяют исследователи изучению состояния отдельных ферментов и ферментных систем при нормальных и патологических процессах в организме.

Ферменты обладают строгой специфичностью к веществам, на которые они воздействуют (субстрат), и проявляют активность при определенных условиях температуры и реакции (рН) среды (нейтральная, кислая, щелочная).

Гистохимическое исследование ферментов имеет свои специфические особенности:

- а) в ходе гистохимической реакции выявляется не сам фермент, а продукт, образующийся в результате взаимодействия фермента с субстратом (веществом, на которое воздействует данный фермент);*
- б) для определения истинной локализации фермента в микроструктурах необходимо, чтобы продукт его деятельности был тут же осажден в виде нерастворимого соединения, иначе в результате диффузии будет получена ложная локализация. В тех случаях, когда осадок бесцветный, его необходимо превратить в окрашенный продукт, видимый в микроскоп. Схематично всю реакцию можно представить в следующем виде:*

Фермент в клетке + субстрат → неокрашенный продукт реакции

Осадитель + проявитель → окрашенный нерастворимый продукт реакции

В конечном итоге мы получаем характеристику активности исследуемого фермента. Чем большее количество продукта образуется в результате взаимодействия фермента и субстрата, тем менее окраска структур и, следовательно, выше активность

фермента. Наоборот, чем слабее окраска, тем активность фермента ниже.

Из сказанного видно, сколь сложен процесс гистохимического определения активности ферментов. Это находит свое отражение и в методических приемах, принципы которых необходимо знать и постоянно помнить в процессе работы.

Так, чувствительность ферментов к изменениям температуры и рН среды приводит к значительной потере их активности при подготовке тканей к заливке в парафин. Хотя в ряде руководств имеются рекомендации по выявлению некоторых ферментов в парафиновых срезах, эти методы не находят широкого применения, так как не являются надежными, особенно для органов и тканей, в которых активность исследуемых ферментов невысока. Наилучшие результаты могут быть достигнуты при изучении срезов нефиксированной ткани, полученных в специальном приборе — криостате, а для ряда ферментов — и срезов, приготовленных с помощью обычного замораживающего микротомы из тканей, предварительно фиксированных охлажденными фиксирующими жидкостями (формалин, ацетон). Существуют и более сложные способы подготовки блоков из нефиксированной ткани с применением специальной аппаратуры.

Специфические особенности и свойства ферментов предъявляют высокие требования к условиям проведения гистохимической реакции, в первую очередь к составлению среды для инкубации срезов. Обязательными ингредиентами последней являются субстрат (специфичный для данного фермента), буферный раствор (обеспечивающий определенную реакцию среды), вещества, препятствующие диффузии продукта реакции. По мере надобности в инкубационную среду вводят и другие компоненты, стимулирующие ход реакции (активирующие деятельность фермента, блокирующие отдельные звенья химических процессов и др.).

2 вопрос

Биологическая роль углеводов многообразна. В организме они выполняют опорные и энергетические функции, некоторые углеводы являются составными частями биологически важных соединений (АТФ, циклической АМФ, нуклеиновых кислот, гепарина, витамина С и др.). Гликопротеиды как специфический компонент иммуноглобулинов играют важную роль в иммунных механизмах, определяя антигенную активность сывороточных и клеточных факторов. Кроме того, продукты расщепления углеводов используются для синтеза практически всех классов соединений в живой клетке.

Выявление углеводов основано, как правило, на методах общего анализа химических групп. Используются методы окисления, метахроматическое окрашивание основными красителями, реакции связывания коллоидных металлов, выявление базофилии, окрашивание кармином, реакции блокирования и превращения реакционноспособных групп, методы ферментативного гидролиза, радиоавтографию, иммуногистохимию.

Реакция Шифф-йодной кислотой (ШИК-реакция).

Метайодная кислота селективно окисляет и расщепляет -C=C-связи не только в 1,2-окси-, но также в 1-окси-2-амино-1-окси-2-алкиламино- и 1-окси-2-кетогруппах. В результате этого образуется одна кетогруппа или две альдегидные группы, как, например, в глюкозе. Альдегидные группы реагируют с реактивом Шиффа (фуксин-

сернистой кислотой) точно так же, как и в реакции Фельгена. С помощью этого метода выявляют все соединения, содержащие оксигруппы, которые в результате окисления метайодной кислоты могут превращаться в альдегидные группы. Однако в гистологических срезах практически лишь гликоген и гликопротеины, сохраняющиеся в достаточных количествах, могут быть выявлены с помощью ШИК-реакции. Гликоген можно дифференцировать от гликопротеинов путем переваривания в амилазе или диастазе.

Для окисления -С-С-связей в полисахаридах предпринимались попытки использовать, помимо одной кислоты, другие окислители-хромовую кислоту, перманганат калия, тетраацетат натрия и т.д. Наиболее удачной является модификация ШИК-реакции, предложенная А.Л. Шабадашем (1949).

1. Материал фиксируют в 10 % формалине, жидкостях Карнуа, Ценкера, заливают в парафин.
2. Депарафинированные срезы доводят до дистиллированной воды.
3. При комнатной температуре срезы окисляют 0,5—1 % водным раствором орто- или метайодной кислоты в течение 2 —10 мин. Окисление можно также проводить по Шабадашу в 0,001—0,01 М метапериодате калия или натрия в течение 7 — 25 мин. Раствор хранят в темноте. Рабочую концентрацию этого раствора и продолжительность инкубации в ней подбирают в зависимости от объекта.
4. Промывают в дистиллированной воде 10 мин.
5. Помещают срезы в реактив Шиффа на 10-30 мин при комнатной температуре в темноте.
6. Срезы промывают сернистой водой (600 мл дистиллированной воды + 30 мл 10 % пиросульфата калия + 30 мл 1 н. соляной кислоты) три раза по 2 мин.
7. Тщательно промывают в проточной и дистиллированной воде, ядра можно докрасить 0,5 % светлым зеленым или кислым гемалауном.
8. Обезживают в спиртах возрастающей концентрации, заключают в бальзам.

Результат: углеводы, содержащие гексозу, окрашиваются в красно-лиловый цвет, гликоген — в более интенсивный темно-красный.

Контроль: расщепление гликогена амилазой или диастазой, реакция ацетилирования для блокирования гидроксильных групп.

Примечание: необходимо пользоваться химически чистой посудой, стеклянными палочками; нельзя работать с металлическими крючками или иголками; окрашивание срезов в реактиве Шиффа следует проводить в темноте.

Билет № 7

1. Основы гистохимических методов исследования. Возможности современных гистохимических методов. Ошибки при проведении гистохимических исследований. Способы оценки гистохимических реакций.
2. Характеристика тучных клеток. Основные гистохимические методы исследования тучных клеток. Оценка полученной реакции.

1 вопрос

Длительное время для изучения химического состава клеток и тканей пользовались исключительно классическими биохимическими методами, в основе которых лежит суммарное определение химических веществ в размельченной ткани (гомогенате). Однако, несмотря на свои положительные качества, эти методы не обеспечивали полного представления о локализации тех или иных химических веществ в различных структурных компонентах клеток и тканей. Поиски методов, с помощью которых можно было бы определять локализацию химических веществ в целостных микроструктурах органов и тканей, привели к созданию гистохимического метода, объединяющего в себе гистологический и биохимический методы.

При гистохимических реакциях неорганические и органические вещества, входящие в состав клеток, вступают в химическую реакцию с различными реактивами (красителями) и образуют окрашенные продукты реакции. По степени интенсивности этих продуктов можно до некоторой степени судить и о количественном содержании химического вещества в той или иной структуре.

В основе большинства гистохимических реакций лежат общие принципы.

- 1. Определенные химические группировки окрашиваются тем или иным красителем. Например, фосфатные группы РНК образуют с основными красителями (пиронин, толуидиновый синий и др.) солеобразные окрашенные соединения*
- 2. Краситель растворяется в определенном субстрате, входящем в состав клеточных структур. Например, окраска жировых включений в клетке основана на растворении Судана в жировой капле.*
- 3. Некоторые химические компоненты клеток, такие, как ДНК, полисахариды, неспособны реагировать с красителями. В таких случаях прибегают к превращению их химических группировок в реакционно-активное состояние (гидролиз ДНК хлористоводородной кислотой, окисление полисахаридов йодной кислотой). При этом освобождаются или создаются вновь химические группировки, которые способны реагировать с соответствующими реактивами, в результате чего образуется окрашенный продукт реакции.*
- 4. При выявлении локализации некоторых компонентов клетки прибегают к многоступенчатым промежуточным реакциям и переводу неокрашенного продукта реакции в окрашенный. Например, так поступают при гистохимическом окрашивании ферментов.*
- 5. Часто приходится прибегать к постановке контрольных реакций – реакций, в которых исследуемое вещество заведомо удалено из среза.*

Новый метод получил широкое распространение в исследовательской практике. В настоящее время ни одна морфологическая лаборатория не обходится без применения гистохимических методик. Однако успешное владение ими требует усвоения определенных навыков и соблюдения ряда условий, так как в отличие от гистологических методик, носящих большей частью эмпирический характер, гистохимические основаны на определенных химических механизмах и обладают строгой специфичностью. Отсюда

главное требование — особая точность и тщательность в работе. Критерием в оценке результатов гистохимической реакции является не только локализация химических веществ, но и интенсивность окраски исследуемых компонентов клеток и тканей, так как именно она свидетельствует о концентрации выявляемых веществ. Если при гистологической обработке материала возможны некоторые отклонения в ходе окрашивания препарата, то приемы, используемые для подготовки материала и проведения гистохимических реакций, должны тщательно соблюдаться, ибо отклонения на любом этапе могут изменить ход реакции и в конечном итоге привести к неправильной оценке препарата.

Для создания надлежащих условий протекания химических реакций особое внимание нужно уделить приготовлению рабочих растворов, а также чистоте применяемой посуды и стекол, качеству реактивов и т. д.

Стандартным способом оценки гистохимической реакции является полуколичественный подсчет интенсивности окрашивания. В настоящее время гистохимия перешла на количественный уровень исследования с применением специальных приборов (цитоспектрофотометров), позволяющих довольно точно определять количественную характеристику интенсивности окраски (продукта реакции), что особенно важно для оценки состояния метаболизма в исследуемых органах, тканях и отдельных клетках. Это еще в большей степени предъявляет повышенные требования к качеству проведения гистохимических реакций и соблюдению строгой стандартизации обработки сравниваемых объектов на всех этапах. Именно в этих целях в первую очередь применяют совмещение сравниваемых образцов в одном блоке с последующим получением срезов одинаковой толщины на одном стекле. Когда это сделать невозможно, необходимо в ходе резки располагать разные срезы на одном предметном стекле. При любом способе совмещения сравниваемые срезы следует подвергать всем этапам гистохимических реакций одновременно, используя одни и те же порции реактивов.

2 вопрос

Тучные клетки (ТК) (тканевые базофилы, мастоциты, лаброциты) – это многофункциональная клеточная популяция, участвующая в обеспечении местного гомеостаза соединительной ткани, поддержании отдельных параметров функциональных систем организма (регуляция свертываемости крови, проницаемости гематотканного барьера и др.), защитных реакциях врожденного и адаптивного иммунитета (воспаление, защита от микроорганизмов, многоклеточных паразитов, иммуногенез). Своими свойствами они обязаны наличию широкого спектра биологически активных веществ, заключенных в специфические гранулы. Клетки подобного типа идентифицированы у всех видов исследованных позвоночных. ТК млекопитающих относятся к клеткам миелоидного ряда и имеют костномозговое происхождение, общее с базофилами крови. Морфологически и функционально ТК сходны с базофилами, однако в отличие от базофилов, относящихся к клеткам крови, их окончательная дифференцировка и созревание завершаются в соединительной ткани. Из костного мозга недифференцированные мононуклеарные предшественники ТК поступают в кровь, а

затем мигрируют в барьерные ткани и органы: слизистые оболочки (особенно пищеварительного тракта), дерму кожи, серозные оболочки, селезенку, периваскулярные области и становятся резидентными клетками соединительной ткани. В тканях происходит созревание специфических гранул ТК, содержащих разнообразные биологически активные вещества – в основном, медиаторы, с помощью которых ТК влияют на свое микроокружение: в первую очередь на проницаемость сосудов микроциркуляторного русла и функции клеток соединительной ткани, поддерживая ее нормальный гомеостаз.

Функциональная активность ТК зависит от спектра секретируемых ими биологически активных веществ. Среди медиаторов ТК принято различать так называемые преформированные, синтезируемые покоящимися ТК и накапливаемые в их гранулах, и вновь генерированные, образуемые только стимулированными ТК. К преформированным медиаторам относятся биогенные амины (гистамин, серотонин), гликозаминогликаны (гепарин и хондроитинсульфаты), а также ферменты (трипаза, химаза и др.). Среди вновь синтезированных медиаторов выделяют различные метаболиты арахидоновой кислоты – простагландин D₂ (PGD₂) и лейкотриен D₄ (LTD₄), фактор активации тромбоцитов (PAF), цитокины, хемокины и др. Преформированные медиаторы выделяются из ТК быстро, а метаболиты арахидоновой кислоты – значительно медленнее.

Синтетическую активность тучных клеток различных компартментов оценивают путем подсчета индекса насыщения и дегрануляции. Оценка содержания гранул тучных клеток осуществлялась на серийных гистологических срезах толщиной 6-7 мкм или мазках перитонеального экссудата, окрашенных 0,1% водным раствором толудинового синего (рН 4,9). По степени метахромазии и количеству гранул всю популяцию тучных клеток можно разделить на 4 группы: 1 группа - очень темные клетки (1 степень); 2 группа - темные клетки (2 степень); 3 группа - светлые клетки (3 степень); 4 группа - очень светлые клетки (4 степень). Индекс гранулярного насыщения рассчитывался в условных единицах как отношение суммы всех темных клеток к сумме всех светлых клеток. Сходным способом оценивается и индекс дегрануляции.

Билет № 8

1. Источники развития, распространенность и морфология бокаловидных клеток. Секреторная активность бокаловидных клеток. Основные гистохимические методы исследования бокаловидных клеток.
2. Окислительно-восстановительные ферменты: понятие, значение, методы выявления (на примере дегидрогеназ).

1 вопрос

Бокаловидная клетка — секретирующая слизь клетка эпителия слизистой оболочки кишечника или другого органа. Также называется энтероцит бокаловидный, бокаловидный экзокриноцит или клетка гоблет.

Бокаловидные клетки располагаются на кишечных ворсинках поодиночке среди клеток каёмчатых. На вершинах кишечных ворсинок, а также на дне либеркюновых

желез (кишечных крипт) бокаловидные клетки чаще всего отсутствуют. В тонкой кишке человека бокаловидные клетки составляют 9,5 % от всех клеток эпителия. Число бокаловидных клеток увеличивается в дистальном направлении кишки.

Кроме кишечника, бокаловидные клетки имеются в слизистой оболочке дыхательных путей, в конъюнктиве глаз, протоках поджелудочной и околоушных слюнных желез.

Бокаловидные клетки накапливают гранулы муциногена, которые, абсорбируя воду, набухают и превращаются в муцин. Клетки обретают форму бокала, суженного у основания и широкого и округлого в верхней части. После чего набухшая верхняя часть бокаловидной клетки разрушается, слизь переходит в просвет органа, клетка приобретает призматическую форму и снова начинает накапливать муциноген. Слизь, выделяемая бокаловидными клетками, увлажняет поверхность слизистой оболочки кишечника и этим способствует продвижению химуса, а также участвует в процессах пристеночного пищеварения.

Направленная в просвет кишки часть бокаловидных клеток имеет исчерченную каймку, подобно клеткам каймчатым. Однако, в отличие от клеток каймчатых, микроворсинки каймки у бокаловидных клеток расположены реже и различны по высоте.

Визуализировать бокаловидные клетки на гистологических срезах можно и при стандартной окраске гематоксилином и эозином, но гораздо эффективнее будет использовать специфические окраски на слизь. Среди последних вполне подойдет окраска ШИК или окраска альциановым синим.

2 вопрос

Этот класс ферментов осуществляет важнейший этап обменных процессов в живых организмах — биологическое окисление различных веществ, образующихся в процессе обмена белков, жиров и углеводов.

В ходе биологического окисления происходят выработка и накопление энергетических ресурсов клетки, используемых ею для осуществления своих жизненных функций. Этот сложный многоступенчатый процесс совершается последовательно с помощью целой цепи, состоящей из ферментов и вспомогательных соединений. Суть его заключается в отщеплении от окисляемого субстрата атома водорода и переноса его электрона к кислороду. При этом атомарный кислород, поступающий в ткани из крови, активируется и, соединяясь с протоном водорода, образует молекулу воды. Столь важная роль окислительных ферментов в обеспечении обмена в органах и тканях определяет большой интерес к их изучению. Различают три основные группы окислительных ферментов:

- 1) дегидрогеназы, катализирующие первый этап окисления — отнятие водорода от субстрата и перенос на промежуточное соединение окислительной цепи;*
- 2) оксидазы, катализирующие перенос электрона от промежуточного соединения к кислороду;*
- 3) пероксидазы, обеспечивающие перенос электрона к перекисям.*

Наибольшее применение в гистохимии окислительных ферментов получили методы выявления дегидрогеназ. Они основаны на свойстве солей тетразолия легко восстанавливаться (присоединяя электрон водорода), переходя при этом из бесцветной

растворенной в воде соли в нерастворимые окрашенные в темно-синий цвет мельчайшие кристаллы формазана.

Необходимо знать, что если ткани содержат большое количество липидов, то они искажают ход гистохимической реакции за счет собственного окисления, в результате выпадают грубые, неправильной формы, темные, крупные кристаллы. В этих случаях следует предварительно, поместить срезы на 1—2 мин в охлажденный (-5° , -10°C) ацетон.

Разберемся подробнее на примере выявления сукцинатдегидрогеназы по Нахласу. Используются срезы из свежесзамороженной ткани, приготовленные в криостате и наклеенные на предметные стекла.

Приготовление исходных растворов.

А — 0,2 М раствор сукцината натрия (27 г соли растворить в 100 мл дистиллированной воды);

Б — 0,2 М фосфатный буфер (рН 7,6) — 100 мл;

В — 30 мг нитросинего тетразолия (нитро СТ) растворить в 30 мл дистиллированной воды.

Инкубационная среда.

Слить равные количества растворов А и Б и добавить раствор В в количестве, равном сумме первых двух.

- 1. Приготовленные в криостате и подсушенные на воздухе срезы инкубировать в термостате при 37°C 10—30 мин.*
- 2. Ополоснуть в изотоническом растворе хлорида натрия.*
- 3. Поместить на 10 мин в 10% раствор формалина, приготовленный на изотоническом растворе хлорида натрия.*
- 4. Промыть в 15% этиловом спирте в течение 45 мин.*
- 5. Обезводить в спиртах и заключить в бальзам.*

Результат: темно-синий осадок локализуется в структурах, обладающих ферментативной активностью.

Подобным образом выявляется активность прочих дегидрогеназ, меняются только среда инкубации и способы заключения препаратов.

Билет № 9

- 1. Источники развития, распространенность и морфология тучных клеток. Гранулы тучных клеток: разновидности, функциональное значение БАВ, входящих в их состав. Оценка функциональной активности тучных клеток: индекс насыщения и дегрануляции.**
- 2. Методы специфического окрашивания нуклеиновых кислот. Строение, локализация и значение нуклеиновых кислот в клетке.**

1 вопрос

Тучные клетки (ТК) (тканевые базофилы, мастоциты, лаброциты) — это многофункциональная клеточная популяция, участвующая в обеспечении местного гомеостаза соединительной ткани, поддержании отдельных параметров

функциональных систем организма (регуляция свертываемости крови, проницаемости гематотканного барьера и др.), защитных реакциях врожденного и адаптивного иммунитета (воспаление, защита от микроорганизмов, многоклеточных паразитов, иммуногенез). Своими свойствами они обязаны наличию широкого спектра биологически активных веществ, заключенных в специфические гранулы. Клетки подобного типа идентифицированы у всех видов исследованных позвоночных. ТК млекопитающих относятся к клеткам миелоидного ряда и имеют костномозговое происхождение, общее с базофилами крови. Морфологически и функционально ТК сходны с базофилами, однако в отличие от базофилов, относящихся к клеткам крови, их окончательная дифференцировка и созревание завершаются в соединительной ткани. Из костного мозга недифференцированные мононуклеарные предшественники ТК поступают в кровь, а затем мигрируют в барьерные ткани и органы: слизистые оболочки (особенно пищеварительного тракта), дерму кожи, серозные оболочки, селезенку, периваскулярные области и становятся резидентными клетками соединительной ткани. В тканях происходит созревание специфических гранул ТК, содержащих разнообразные биологически активные вещества – в основном, медиаторы, с помощью которых ТК влияют на свое микроокружение: в первую очередь на проницаемость сосудов микроциркуляторного русла и функции клеток соединительной ткани, поддерживая ее нормальный гомеостаз.

Функциональная активность ТК зависит от спектра секретируемых ими биологически активных веществ. Среди медиаторов ТК принято различать так называемые преформированные, синтезируемые покоящимися ТК и накапливаемые в их гранулах, и вновь генерированные, образуемые только стимулированными ТК. К преформированным медиаторам относятся биогенные амины (гистамин, серотонин), гликозаминогликаны (гепарин и хондроитинсульфаты), а также ферменты (трипаза, химаза и др.). Среди вновь синтезированных медиаторов выделяют различные метаболиты арахидоновой кислоты – простагландин D₂ (PGD₂) и лейкотриен D₄ (LTD₄), фактор активации тромбоцитов (PAF), цитокины, хемокины и др. Преформированные медиаторы выделяются из ТК быстро, а метаболиты арахидоновой кислоты – значительно медленнее.

Синтетическую активность тучных клеток различных компартментов оценивают путем подсчета индекса насыщения и дегрануляции. Оценка содержания гранул тучных клеток осуществлялась на серийных гистологических срезах толщиной 6-7 мкм или мазках перитонеального экссудата, окрашенных 0,1% водным раствором толуидинового синего (рН 4,9). По степени метахромазии и количеству гранул всю популяцию тучных клеток можно разделить на 4 группы: 1 группа - очень темные клетки (1 степень); 2 группа - темные клетки (2 степень); 3 группа - светлые клетки (3 степень); 4 группа - очень светлые клетки (4 степень). Индекс гранулярного насыщения рассчитывался в условных единицах как отношение суммы всех темных клеток к сумме всех светлых клеток. Сходным способом оценивается и индекс дегрануляции.

2 вопрос

Существует несколько способов гистохимического выявления нуклеиновых кислот, но

наибольшее распространение получил метод Браше (для выявления РНК) и метод Фельгена (для выявления ДНК).

1. Метод Браше: окраска пиронином-метиловым зеленым. Сущность метода заключается в избирательном присоединении основных красителей к нуклеиновым кислотам – пиронина к РНК (дает красное окрашивание), метилового зеленого к ДНК (дает зеленое окрашивание). Для контроля РНК перед окрашиванием требуется обработка препаратов рибонуклеазой.

2. Метод Фельгена: гидролиз в 1 N растворе HCl для освобождения альдегидных группировок дезоксирибозы (составной части молекулы ДНК). Обработка реактивом Шиффа – фуксинсернистой кислотой – бесцветным соединением, обладающим высокой степенью чувствительности к альдегидам. Соединяясь с фуксинсернистой кислотой, альдегиды переводят ее в осединение, окрашенное в яркий красно-фиолетовый цвет. Реакция специфичная.

Нуклеиновые кислоты (высокомолекулярные соединения сложного химического состава) играют чрезвычайно важную роль в обеспечении жизнедеятельности любой животной клетки. Рибонуклеиновая кислота (РНК) осуществляет синтез белков, а дезоксирибонуклеиновая (ДНК) — хранение и передачу наследственных признаков. Первая содержится в цитоплазме и ядрышках, вторая — в хроматине ядер. Нуклеиновые кислоты являются полимерами, мономерами которых служат нуклеотиды, состоящие в свою очередь из сахара (пентозы), азотистого основания и остатка фосфорной кислоты.

Билет № 10

1. Характеристика липидов. Общие принципы выявления липидов. Основные химические методы гистохимического выявления липидов.
2. Понятие об энзимогистохимическом исследовании. Основные этапы подготовки тканей для гистохимического выявления ферментов. Источники ошибок и артефактов.

1 вопрос

Собирательный термин «липиды» охватывает жиры (т.е. триглицериды) и жироподобные вещества растительного и животного происхождения. Это преимущественно неполярные соединения, основным компонентом которых являются жирные кислоты. Липиды нерастворимы или плохо растворимы в воде, но хорошо растворяются в типичных жирорастворителях: бензине, хлороформе, четыреххлористом углероде, ацетоне, эфире, петролейном эфире, горячем спирте и т.п. Не все липиды растворимы в указанных растворителях одинаково, на этом основаны дифференциальная экстракция липидов и выявление их с помощью жирорастворимых красителей.

С учетом гистохимических свойств и химической структуры липиды делят на простые (нейтральные жиры, воски, стериды) и сложные (фосфолипиды, цереброзиды, ганглиозиды, сульфолипиды).

Гистохимическое выявление липидов возможно с помощью физических и химических методов. К физическим относятся методы экстракции, поляризационная микроскопия и

окрашивание жирорастворимыми красителями, к химическим — подавляющее большинство гистохимических методов выявления липидов, направленных главным образом на определение активных функциональных групп.

Для всех жировых красителей единственным общим признаком является отсутствие солюбилизирующих сульфогрупп ($-SO_3H$) или карбоксильных ($-COOH$)-групп. Это диазокрасители, в основном красного цвета. Наиболее распространенный вариант это окраса суданами.

Судан черный В обладает более выраженными, чем суданы III и IV, красящими свойствами, хотя он может давать и гораздо более слабое окрашивание белков и кислых ГАГ.

Окраска Суданом черным по Лизону

1. Материал фиксируют в кальций-формоле, готовят срезы на замораживающем микротоме или заливают в поливакс.
2. Промывают срезы в 70 % спирте.
3. Окрашивают Суданом черным (насыщенный раствор Судана В в 70 % спирте, профильтрованный перед использованием) 20 — 30 мин.
4. Промывают в 70 % спирте 30 с.
5. Быстро промывают в дистиллированной воде.
6. Окрашивают 1 % ядерным прочным красным 1 мин.
7. Быстро промывают в дистиллированной воде и заключают в глицерин-желатин или глицерин.

Результат: липиды окрашиваются в цвета от черного до темно-синего, ядра — в красный цвет; окраску воспринимают также фосфолипиды.

Для контроля неспецифического окрашивания за счет адсорбции используют экстракцию ацетоном или этанолом.

Окраска масляным красным О в изопропанол по Лилли

1. Материал фиксируют в кальций-формоле, срезы получают на замораживающем микротоме.
2. Срезы переносят в дистиллированную воду и быстро промывают в 60 % изопропанол.
3. Срезы окрашивают 10 — 20 мин в растворе масляного красного О (0,05 г масляного красного О растворяют в 100 мл 98 % изопропанола, перед использованием разводят дистиллированной водой в пропорции 6:4, выдерживают 24 ч и затем фильтруют).
4. Быстро дифференцируют в 60 % изопропанол или сразу же промывают в дистиллированной воде.
5. Промывают в проточной воде 10 мин.
6. Срезы заключают в глицерин-желатин.

Результат: нейтральные жиры окрашиваются в красный цвет, ядра — в синий.

2 вопрос

Энзимогистохимическое исследование – исследование гистологического среза органа на наличие и активность того или определенного фермента. Ферменты — белковые

вещества, выполняющие роль биологических катализаторов. Чрезвычайно важны для обеспечения обменных процессов в живых организмах. Они играют основную роль в обеспечении и регулировке биохимических реакций в живых структурах, в силу чего наиболее ранние этапы нарушения обмена, ведущие в дальнейшем к морфологическим изменениям микроструктур, обнаруживаемых обычными гистологическими методами, происходят преимущественно в сфере деятельности ферментов.

Ферменты обладают строгой специфичностью к веществам, на которые они воздействуют (субстрат), и проявляют активность при определенных условиях температуры и реакции (рН) среды (нейтральная, кислая, щелочная).

Гистохимическое исследование ферментов имеет свои специфические особенности:

- а) в ходе гистохимической реакции выявляется не сам фермент, а продукт, образующийся в результате взаимодействия фермента с субстратом (веществом, на которое воздействует данный фермент);
- б) для определения истинной локализации фермента в микроструктурах необходимо, чтобы продукт его деятельности был тут же осажден в виде нерастворимого соединения, иначе в результате диффузии будет получена ложная локализация. В тех случаях, когда осадок бесцветный, его необходимо превратить в окрашенный продукт, видимый в микроскоп. Схематично всю реакцию можно представить в следующем виде:

Фермент в клетке + субстрат > неокрашенный продукт реакции

Осадитель + проявитель > окрашенный нерастворимый продукт реакции

В конечном итоге мы получаем характеристику активности исследуемого фермента. Чем большее количество продукта образуется в результате взаимодействия фермента и субстрата, тем менее окраска структур и, следовательно, выше активность фермента. Наоборот, чем слабее окраска, тем активность фермента ниже.

Из сказанного видно, сколь сложен процесс гистохимического определения активности ферментов. Это находит свое отражение и в методических приемах, принципы которых необходимо знать и постоянно помнить в процессе работы.

Так, чувствительность ферментов к изменениям температуры и рН среды приводит к значительной потере их активности при подготовке тканей к заливке в парафин. Хотя в ряде руководств имеются рекомендации по выявлению некоторых ферментов в парафиновых срезах, эти методы не находят широкого применения, так как не являются надежными, особенно для органов и тканей, в которых активность исследуемых ферментов невысока. Наилучшие результаты могут быть достигнуты при изучении срезов нефиксированной ткани, полученных в специальном приборе — криостате, а для ряда ферментов — и срезов, приготовленных с помощью обычного замораживающего микротомы из тканей, предварительно фиксированных охлажденными фиксирующими жидкостями (формалин, ацетон). Существуют и более сложные способы подготовки блоков из нефиксированной ткани с применением специальной аппаратуры.

Специфические особенности и свойства ферментов предъявляют высокие требования к условиям проведения гистохимической реакции, в первую очередь к составлению среды для инкубации срезов. Обязательными ингредиентами последней являются субстрат

(специфичный для данного фермента), буферный раствор (обеспечивающий определенную реакцию среды), вещества, препятствующие диффузии продукта реакции. По мере надобности в инкубационную среду вводят и другие компоненты, стимулирующие ход реакции (активирующие деятельность фермента, блокирующие отдельные звенья химических процессов и др.).

В настоящее время разработаны методы выявления довольно большого количества ферментов, перечислить которые в настоящем руководстве не представляется возможным. Остановимся лишь на некоторых, наиболее часто применяемых в гистологических лабораториях. К ним следует отнести методы выявления активности ряда гидролитических и окислительных ферментов.

Билет № 11

1. Основы гистохимических методов исследования макрофагов. Ошибки при постановке реакций. Оценка результатов гистохимических методов исследования макрофагов.
2. Углеводы: строение, разновидности, локализация в клетке. Принципы гистохимических реакций на выявление углеводов.

1 вопрос

Макрофаги – это гетерогенная клеточная популяция, источником развития которой являются моноциты периферической крови. Макрофаг имеет неправильную, звездчатую, многоотростчатую форму, складки и микроворсинки на поверхности клеток, обилие эндоцитозных микровезикул, первичных и вторичных лизосом. Округлое или эллипсоидное ядро расположено центрально, гетерохроматин локализован под ядерной оболочкой. Структурные особенности клетки во многом зависят от ее органной и тканевой принадлежности, а также от функционального статуса. Так, для клеток Купфера характерен гликокаликс, альвеолярные макрофаги содержат ламеллярные (сурфактантные) тельца, хорошо развитый комплекс Гольджи, шероховатый эндоплазматический ретикулум и множество митохондрий, в то время как в клетках микроглии митохондрии немногочисленны. В цитоплазме перитонеальных и альвеолярных макрофагов присутствует большое количество липидных телец, содержащих субстраты и ферменты генерации простагландинов. Адгезирующиеся и движущиеся макрофаги формируют короткоживущие, содержащие актин структуры – подсосмы – в виде плотной центральной части с радиально отходящими от них микрофиламентами. Макрофаги фагоцитируют чужеродный материал и клеточно-тканевый детрит, стимулируют и регулируют иммунный ответ, индуцируют воспалительную реакцию, участвуют в репаративных процессах и обмене компонентов внеклеточного матрикса. Многообразие осуществляемых функций объясняет экспрессию этими клетками большого числа рецепторов, связанных с плазматической мембраной, внутриклеточных и секретруемых.

Макрофаги входят в систему мононуклеарных фагоцитов. Система мононуклеарных фагоцитов это физиологическая защитная система клеток, обладающих способностью поглощать и переваривать чужеродный материал. Клетки, входящие в состав этой

системы, имеют общее происхождение, характеризуются морфологическим и функциональным сходством и присутствуют во всех тканях организма. Критериями принадлежности к этой системе считают способность к активному пиноцитозу и иммунному фагоцитозу, способность прилипать к стеклянным поверхностям и происхождение из промоцитов костного мозга. При цитологическом исследовании макрофагов первым и важнейшим этапом становится их правильное выделение из материала. Методика выделения может значительно варьироваться исходя из типа изучаемого органа. В последующем необходимо изготовить мазки, окрасить их методикой, позволяющей оценить тот или иной компонент клетки (например, окраска на пероксидазу, активность лизосом и т.д.). Полученные результаты оцениваются полуколичественным методом, с вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Приступая к микроскопии, в каждом отдельном мазке при обзорном просмотре выбирают эталоны – клетки, содержащие исследуемое вещество. Отсутствие окраски цитоплазмы принимается за нулевую степень. Наличие в цитоплазме небольшого окрашенного участка, составляющего 1/4 часть всей цитоплазмы, соответствует интенсивности реакции 1-й степени (А). Окрашивание 8/10 цитоплазмы принимается за 2-ю степень насыщения (В). При 3-й степени интенсивности реакции исследуемое вещество заполняет всю цитоплазму и даже выявляется на ядре. Затем, как при подсчете лейкоцитарной формулы, в разных участках мазка подсчитывают, не пропуская, 100 однотипных клеток и рассчитывают процентное содержание клеточных элементов с различной интенсивностью реакции. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) вычисляется по формуле (по Карлов):

$$\text{СЦК} = 3\text{С} + 2\text{В} + \text{А}$$

При вычислении показателя активности, клетки с интенсивностью 0 исключаются; к проценту клеток с интенсивностью 1 (А) прибавляется процент клеток с интенсивностью 2 (В), умноженный на коэффициент 2 и количество клеток с интенсивностью 3 (С), умноженное на коэффициент 3. Показатель активности в условных единицах от 0 до 300, СЦК 0–3%.

2 вопрос

Функциональное значение углеводов очень разнообразно. В организме они выполняют опорные и энергетические функции, некоторые углеводы являются составными частями биологически важных соединений (АТФ, циклической АМФ, нуклеиновых кислот, гепарина, витамина С и др.). Гликопротеиды как специфический компонент иммуноглобулинов играют важную роль в иммунных механизмах, определяя антигенную активность сывороточных и клеточных факторов. Кроме того, продукты расщепления углеводов используются для синтеза практически всех классов соединений в живой клетке.

Классификация углеводов

В живой клетке углеводы существуют в форме моно-, олиго- и полисахаридов. В гистологических препаратах они сохраняются практически только в виде полисахаридов: во всяком случае только полисахариды могут быть с достоверностью выявлены гистохимически. Правда, возможно также гистохимическое выявление

глюкозы и витамина С.

Общепринятой классификации полисахаридов не существует. Для практических гистохимических целей достаточно разделить полисахариды на гомо- и гетерополисахариды.

Гомополисахариды построены из остатков молекул моносахаридов, главным образом пентозы и гексозы, соединенных между собой кислотными мостиками. Гомополисахаридами являются крахмал, инулин, клетчатка, гликоген. К ним с определенными оговорками можно также отнести хитин и полигалактуроновую кислоту.

Гетерополисахариды разделяют на гликозаминогликаны (ГАГ) и гликопротеины. К кислым гликозаминогликанам ГАГ относят гиалуроновую кислоту, молекула которой построена из остатков глюкуроновой и уксусной кислот и гексозамина; хондроинин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, дерматан-сульфат, кератан-сульфат, гепаритин-сульфат, гепарин, молекулы которых содержат остатки гексозамина, глюкуроновой или уксусной кислот, серной и уксусной кислот в различных сочетаниях. В тканях кислые ГАГ, кроме гепарина, находятся в соединении с белками. Такие комплексы, в которых к белковому стержню присоединены полисахаридные цепи, носят название «протеогликаны». Все эти соединения входят в состав матрикса соединительной ткани, крови, синовиальной жидкости, слизи.

Гликопротеины являются белками, к молекуле которых ковалентно присоединены олигосахариды: гексозы, гексозамины, сиаловые кислоты, фукозы и др. Такие соединения являются составной частью клеточных мембран, слизистых секретов желез, сывороточных белков, ферментов, гормонов, «неколлагеновых белков» соединительной ткани и т.д.

Гистохимическая идентификация углеводов

Выявление углеводов основано, как правило, на методах общего анализа химических групп. Используются методы окисления, метахроматическое окрашивание основными красителями, реакции связывания коллоидных металлов, выявление базофилии, окрашивание кармином, реакции блокирования и превращения реакционноспособных групп, методы ферментативного гидролиза, радиоавтографию, иммуногистохимию.

Билет № 12

1. Химические и физические свойства липидов. Классификация липидов. Локализация липидов в клетках и тканях. Методы фиксации липидов. Принципы, лежащие в основе окраски липидов.
2. Понятие о ферментах. Основные этапы подготовки тканей для гистохимического выявления ферментов. Особенности постановки энзимогистохимических реакций.

1 вопрос

Собирательный термин «липиды» охватывает жиры (т. е. триглицериды) и жироподобные вещества растительного и животного происхождения. Это преимущественно неполярные соединения, основным компонентом которых являются жирные кислоты. Липиды нерастворимы или плохо растворимы в воде, но хорошо

растворяются в типичных жирорастворителях: бензине, хлороформе, четыреххлористом углероде, ацетоне, эфире, петролейном эфире, горячем спирте и т. п. Не все липиды растворимы в указанных растворителях одинаково, на этом основаны дифференциальная экстракция липидов и выявление их с помощью жирорастворимых красителей.

С учетом гистохимических свойств и химической структуры липиды делят на простые (нейтральные жиры, воски, стериды) и сложные (фосфолипиды, цереброзиды, ганглиозиды, сульфоллипиды).

Гистохимическое выявление липидов возможно с помощью физических и химических методов. К физическим относятся методы экстракции, поляризационная микроскопия и окрашивание жирорастворимыми красителями, к химическим — подавляющее большинство гистохимических методов выявления липидов, направленных главным образом на определение активных функциональных групп.

2 вопрос

Ферменты — белковые вещества, выполняющие роль биологических катализаторов. Чрезвычайно важны для обеспечения обменных процессов в живых организмах. Они играют основную роль в обеспечении и регулировке биохимических реакций в живых структурах, в силу чего наиболее ранние этапы нарушения обмена, ведущие в дальнейшем к морфологическим изменениям микроструктур, обнаруживаемых обычными гистологическими методами, происходят преимущественно в сфере деятельности ферментов. Поэтому естественно то большое внимание, которое уделяют исследователи изучению состояния отдельных ферментов и ферментных систем при нормальных и патологических процессах в организме.

Ферменты обладают строгой специфичностью к веществам, на которые они воздействуют (субстрат), и проявляют активность при определенных условиях температуры и реакции (рН) среды (нейтральная, кислая, щелочная).

Гистохимическое исследование ферментов имеет свои специфические особенности:

- а) в ходе гистохимической реакции выявляется не сам фермент, а продукт, образующийся в результате взаимодействия фермента с субстратом (веществом, на которое воздействует данный фермент);
- б) для определения истинной локализации фермента в микроструктурах необходимо, чтобы продукт его деятельности был тут же осажден в виде нерастворимого соединения, иначе в результате диффузии будет получена ложная локализация. В тех случаях, когда осадок бесцветный, его необходимо превратить в окрашенный продукт, видимый в микроскоп. Схематично всю реакцию можно представить в следующем виде:

Фермент в клетке + субстрат > неокрашенный продукт реакции

Осадитель + проявитель > окрашенный нерастворимый продукт реакции

В конечном итоге мы получаем характеристику активности исследуемого фермента. Чем большее количество продукта образуется в результате взаимодействия фермента и субстрата, тем менее окраска структур и, следовательно, выше активность фермента. Наоборот, чем слабее окраска, тем активность фермента ниже.

Из сказанного видно, сколь сложен процесс гистохимического определения активности ферментов. Это находит свое отражение и в методических приемах, принципы которых необходимо знать и постоянно помнить в процессе работы.

Так, чувствительность ферментов к изменениям температуры и рН среды приводит к значительной потере их активности при подготовке тканей к заливке в парафин. Хотя в ряде руководств имеются рекомендации по выявлению некоторых ферментов в парафиновых срезах, эти методы не находят широкого применения, так как не являются надежными, особенно для органов и тканей, в которых активность исследуемых ферментов невысока. Наилучшие результаты могут быть достигнуты при изучении срезов нефиксированной ткани, полученных в специальном приборе — криостате, а для ряда ферментов — и срезов, приготовленных с помощью обычного замораживающего микротомы из тканей, предварительно фиксированных охлажденными фиксирующими жидкостями (формалин, ацетон). Существуют и более сложные способы подготовки блоков из нефиксированной ткани с применением специальной аппаратуры.

Специфические особенности и свойства ферментов предъявляют высокие требования к условиям проведения гистохимической реакции, в первую очередь к составлению среды для инкубации срезов. Обязательными ингредиентами последней являются субстрат (специфичный для данного фермента), буферный раствор (обеспечивающий определенную реакцию среды), вещества, препятствующие диффузии продукта реакции. По мере надобности в инкубационную среду вводят и другие компоненты, стимулирующие ход реакции (активирующие деятельность фермента, блокирующие отдельные звенья химических процессов и др.).

В настоящее время разработаны методы выявления довольно большого количества ферментов, перечислить которые в настоящем руководстве не представляется возможным. Остановимся лишь на некоторых, наиболее часто применяемых в гистологических лабораториях. К ним следует отнести методы выявления активности ряда гидролитических и окислительных ферментов.

Билет № 13

1. Источники развития, распространенность и морфология бокаловидных клеток. Секреторная активность бокаловидных клеток. Оценка функциональной активности бокаловидных клеток.
2. Характеристика липидов. Общие принципы выявления липидов. Основные химические методы гистохимического выявления липидов.

1 вопрос

Бокаловидная клетка — секреторная слизь клетка эпителия слизистой оболочки кишечника или другого органа. Также называется энтероцит бокаловидный, бокаловидный экзокриноцит или клетка гоблет.

Бокаловидные клетки располагаются на кишечных ворсинках поодиночке среди клеток каёмчатых. На вершинах кишечных ворсинок, а также на дне либеркюновых желёз (кишечных крипт) бокаловидные клетки чаще всего отсутствуют. В тонкой кишке человека бокаловидные клетки составляют 9,5 % от всех клеток эпителия. Число

бокаловидных клеток увеличивается в дистальном направлении кишки.

Кроме кишечника, бокаловидные клетки имеются в слизистой оболочке дыхательных путей, в конъюнктиве глаз, протоках поджелудочной и околоушных слюнных желёз.

Бокаловидные клетки накапливают гранулы муциногена, которые, абсорбируя воду, набухают и превращаются в муцин. Клетки обретают форму бокала, суженного у основания и широкого и округлого в верхней части. После чего набухшая верхняя часть бокаловидной клетки разрушается, слизь переходит в просвет органа, клетка приобретает призматическую форму и снова начинает накапливать муциноген. Слизь, выделяемая бокаловидными клетками, увлажняет поверхности слизистой оболочки кишечника и этим способствует продвижению химуса, а также участвует в процессах пристеночного пищеварения.

Направленная в просвет кишки часть бокаловидных клеток имеет исчерченную каймку, подобно клеткам каймчатым. Однако, в отличие от клеток каймчатых, микроворсинки каймки у бокаловидных клеток расположены реже и различны по высоте.

Визуализировать бокаловидные клетки на гистологических срезах можно и при стандартной окраске гематоксилином и эозином, но гораздо эффективнее будет использовать специфические окраски на слизь. Среди последних вполне подойдет окраска ШИК или окраска альциановым синим.

2 вопрос

Собирательный термин «липиды» охватывает жиры (т.е. триглицериды) и жироподобные вещества растительного и животного происхождения. Это преимущественно неполярные соединения, основным компонентом которых являются жирные кислоты. Липиды нерастворимы или плохо растворимы в воде, но хорошо растворяются в типичных жирорастворителях: бензине, хлороформе, четыреххлористом углероде, ацетоне, эфире, петролейном эфире, горячем спирте и т.п. Не все липиды растворимы в указанных растворителях одинаково, на этом основаны дифференциальная экстракция липидов и выявление их с помощью жирорастворимых красителей.

С учетом гистохимических свойств и химической структуры липиды делят на простые (нейтральные жиры, воски, стериды) и сложные (фосфолипиды, цереброзиды, ганглиозиды, сульфоллипиды).

Гистохимическое выявление липидов возможно с помощью физических и химических методов. К физическим относятся методы экстракции, поляризационная микроскопия и окрашивание жирорастворимыми красителями, к химическим — подавляющее большинство гистохимических методов выявления липидов, направленных главным образом на определение активных функциональных групп.

Для всех жировых красителей единственным общим признаком является отсутствие солюбилизирующих сульфогрупп ($-SO_3H$) или карбоксильных ($-COOH$)-групп. Это диазокрасители, в основном красного цвета. Наиболее распространенный вариант это окраса суданами.

Судан черный В обладает более выраженными, чем суданы III и IV, красящими свойствами, хотя он может давать и гораздо более слабое окрашивание белков и кислых

ГАГ.

Окраска Суданом черным по Лизону

1. *Материал фиксируют в кальций-формоле, готовят срезы на замораживающем микротоме или заливают в поливакс.*
2. *Промывают срезы в 70 % спирте.*
3. *Окрашивают Суданом черным (насыщенный раствор Судана В в 70 % спирте, профильтрованный перед использованием) 20 — 30 мин.*
4. *Промывают в 70 % спирте 30 с.*
5. *Быстро промывают в дистиллированной воде.*
6. *Окрашивают 1 % ядерным прочным красным 1 мин.*
7. *Быстро промывают в дистиллированной воде и заключают в глицерин-желатин или глицерин.*

Результат: липиды окрашиваются в цвета от черного до темно-синего, ядра — в красный цвет; окраску воспринимают также фосфолипиды.

Для контроля неспецифического окрашивания за счет адсорбции используют экстракцию ацетоном или этанолом.

Окраска масляным красным О в изопропанол по Лилли

1. *Материал фиксируют в кальций-формоле, срезы получают на замораживающем микротоме.*
2. *Срезы переносят в дистиллированную воду и быстро промывают в 60 % изопропанол.*
3. *Срезы окрашивают 10 — 20 мин в растворе масляного красного О (0,05 г масляного красного О растворяют в 100 мл 98 % изопропанола, перед использованием разводят дистиллированной водой в пропорции 6:4, выдерживают 24 ч и затем фильтруют).*
4. *Быстро дифференцируют в 60 % изопропанол или сразу же промывают в дистиллированной воде.*
5. *Промывают в проточной воде 10 мин.*
6. *Срезы заключают в глицерин-желатин.*

Результат: нейтральные жиры окрашиваются в красный цвет, ядра — в синий.

Билет № 14

1. Принцип приготовления свежзамороженных срезов для гистохимических исследований (достоинства и недостатки). Криотомия.
2. Методы выявления белков. Определение белковых функциональных групп.

1 вопрос

Криомикротомия (криотомия) — процесс изготовления гистологических срезов из замороженного материала с использованием криостата. К основным преимуществам данного варианта исследования можно отнести:

4. *Позволяет быстро и точно произвести исследование материала (эксперс-диагностика в клинической практике);*
5. *Позволяет максимально сохранить в тканях и клетках вещества, хорошо*

растворимые в органических растворителях (в частности, большинство липидов);

- 6. Позволяет производить гисто- и цитохимическую оценку веществ, которые быстро разрушаются в тканях после отделения последних от живого организма (многие ферменты).*

Среди основных недостатков можно выделить следующие:

- 5. Срезы, как правило, являются достаточно толстыми;*
- 6. Из некоторых органов и тканей, отдельные микроструктуры которых рыхло соединены между собой, нельзя получить замороженные срезы;*
- 7. Отсутствие возможности изготовления среза из сильно обводненной ткани;*
- 8. Острая необходимость предварительного включения криостата.*

2 вопрос

Реакция нингидрин-Шифф

Под действием нингидрина происходит окислительное дезаминирование аминокислоты белков с образованием углекислоты, альдегида и красителя. Этот краситель голубовато-фиолетового цвета легко подвержен диффузии, легко распадается и не удовлетворяет современным гистохимическим требованиям. Однако можно использовать окислительные свойства нингидрина и выявить образующиеся альдегидные группы с помощью реактива Шиффа.

- 1. Материал фиксируют в жидкостях Карнуа, Ценкера, этиловом спирте с 5 % уксусной кислотой, заливают в парафин.*
- 2. Депарафинируют срезы и промывают в 2 сменах 100 % спирта.*
- 3. Обрабатывают 0,5 % нингидрином или 1 % раствором аллоксана в 100% спирте (16-20 ч при 37 °С).*
- 4. Промывают проточной водой 2-5 мин.*
- 5. Переносят в реактив Шиффа на 30 мин при комнатной температуре.*
- 6. Промывают в 3-4 сменах смеси, состоящей из 200 мл дистиллированной воды, 10 мл 10 % гидросульфита натрия и 10 мл 1 н. соляной кислоты 2 мин.*
- 7. Промывают проточной водой 10 мин.*
- 8. Обезвоживают в спиртах, просветляют в ксилоле; заключают в бальзам.*

Результат: NH₂-группы, связанные с белком, приобретают окраску от красной до красно-фиолетовой.

Гистохимическое выявление тирозина: реакция Миллона в модификации Бейкера

- 1. Материал фиксируют в формальдегиде, заливают в парафин или целлоидин.*
- 2. Депарафинированные срезы проводят через 50 % спирт до дистиллированной воды. Целлоидиновые срезы толщиной 20-30 мкм проводят так же.*
- 3. Помещают в стеклянный сосуд с реактивом Миллона: к 100 мл 10 % раствора серной кислоты добавляют 10 г сульфата ртути (II), при нагревании растворяют; раствор охлаждают и доводят дистиллированной водой до 200 мл; к 5 мл этого раствора перед использованием добавляют 0,5 мл 0,25 % раствора нитрита натрия и нагревают до кипения.*
- 4. Охлаждают до комнатной температуры в течение нескольких минут.*

5. Промывают в 3 сменах дистиллированной воды по 2 мин.
6. Заключают в глицерин-желатин или обезвоживают в спирте и заключают в бальзам через ксилол.

Результат: положительная реакция проявляется красным или желтовато-красным окрашиванием, интенсивность которого зависит от количества тирозина в структурах, содержащих белок.

Гистохимическое выявление триптофана: реакция с диметил-аминобензальдегид-нитритом по Адамсу

1. Материал фиксируют в 4-10 % формалине 4-12 ч; в 80 % спирте с 1% трихлоруксусной кислотой 24 ч, заливают в парафин.
2. Депарафинированные в ксилоле срезы проводят через 100 % спирт, просушивают при температуре 30-40 °С.
3. Обрабатывают 50 % *n*-диметиламинобензальдегидом в концентрированной соляной кислоте 1 мин.
4. Помещают в 1 % нитрит натрия в концентрированной соляной кислоте на 1 мин.
5. Промывают срезы в проточной воде 30 с.
6. Быстро промывают в 1 % солянокислом спирте.
7. Обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации, просветляют в ксилоле, заключают в бальзам.

Результат: белки, содержащие триптофан, окрашиваются в темно-синий цвет различной интенсивности; интенсивно окрашиваются гранулы клеток Панета, гранулы пепсиногена в главных клетках желез желудка, зимогенные гранулы экзокринных клеток поджелудочной железы, мышцы, фибрин, фибриноген, нейрокератин, чехлы волосяных луковиц.

Гистохимическое выявление аргинина: реакция Сакагучи для выявления аргинина в модификации Бейкера

1. Материал фиксируют в жидкостях Ценкера, Буэна, Карнуа, «Суза» (допустима также фиксация в нейтральном формалине), заливают в парафин.
2. Депарафинированные в ксилоле или толуоле срезы после обработки 100 % спиртом покрывают тонкой пленкой целлоидина (1 % раствор целлоидина в смеси спирта с эфиром 1:1) и уплотняют в 70 % спирте.
3. Доводят через 50 % спирт до дистиллированной воды и тщательно промывают.
4. Извлеченные из воды срезы высушивают на воздухе.
5. Обрабатывают 15 мин раствором α -нафтол-гипохлорита натрия, который готовят непосредственно перед использованием: к 4 мл 1 % гидроксида натрия добавляют 4 капли 1 % α -нафтола на 70% спирте и 8 капель 1 % гипохлорита натрия.
1. Реакция окрашивания развивается в реакционной смеси постепенно.
6. Сливают реактив с предметного стекла, препараты осторожно просушивают фильтровальной бумагой и помещают на 3 мин в смесь высушенного пиридина и безводного хлороформа.
7. Заключают под покровное стекло в смесь пиридина с хлороформом или в

безводный пиридин. Поскольку сохранность таких срезов непродолжительна, рекомендуют просматривать и фотографировать их сразу после приготовления. Результат: белки, содержащие аргинин, окрашиваются в оранжевый цвет разных оттенков.

Билет № 15

1. Значение, строение и локализация нуклеиновых кислот в клетке. Особенности реакций нуклеиновых кислот с различными химическими соединениями.
2. Основы гистохимических методов исследования макрофагов. Ошибки при постановке реакций. Оценка результатов гистохимических методов исследования макрофагов.

1 вопрос

Нуклеиновые кислоты (высокомолекулярные соединения сложного химического состава) играют чрезвычайно важную роль в обеспечении жизнедеятельности любой животной клетки. Рибонуклеиновая кислота (РНК) осуществляет синтез белков, а дезоксирибонуклеиновая (ДНК) — хранение и передачу наследственных признаков. Первая содержится в цитоплазме и ядрышках, вторая — в хроматине ядер. Столь важная роль нуклеиновых кислот является причиной большого интереса к изучению их содержания и распространения в органах и тканях организма. Существует несколько способов гистохимического выявления нуклеиновых кислот, но наибольшее распространение получил метод Браше (для выявления РНК) и метод Фельгена (для выявления ДНК).

1. Метод Браше: окраска пиронином-метиловым зеленым. Сущность метода заключается в избирательном присоединении основных красителей к нуклеиновым кислотам – пиронина к РНК (дает красное окрашивание), метилового зеленого к ДНК (дает зеленое окрашивание). Для контроля РНК перед окрашиванием требуется обработка препаратов рибонуклеазой.

2. Метод Фельгена: гидролиз в 1 N растворе HCl для освобождения альдегидных группировок дезоксирибозы (составной части молекулы ДНК). Обработка реактивом Шиффа – фуксинсернистой кислотой – бесцветным соединением, обладающим высокой степенью чувствительности к альдегидам. Соединяясь с фуксинсернистой кислотой, альдегиды переводят ее в осединение, окрашенное в яркий красно-фиолетовый цвет. Реакция специфичная.

2 вопрос

Макрофаги – это гетерогенная клеточная популяция, источником развития которой являются моноциты периферической крови. Макрофаг имеет неправильную, звездчатую, многоотростчатую форму, складки и микроворсинки на поверхности клеток, обилие эндоцитозных микровезикул, первичных и вторичных лизосом. Округлое или эллипсоидное ядро расположено центрально, гетерохроматин локализован под ядерной оболочкой. Структурные особенности клетки во многом зависят от ее органной и тканевой принадлежности, а также от функционального статуса. Так, для клеток Купфера характерен гликокаликс, альвеолярные макрофаги содержат ламеллярные

(сурфактантные) тельца, хорошо развитый комплекс Гольджи, шероховатый эндоплазматический ретикулум и множество митохондрий, в то время как в клетках микроглии митохондрии немногочисленны. В цитоплазме перитонеальных и альвеолярных макрофагов присутствует большое количество липидных телец, содержащих субстраты и ферменты генерации простагландинов. Адгезирующие и движущиеся макрофаги формируют короткоживущие, содержащие актин структуры – подосомы – в виде плотной центральной части с радиально отходящими от них микрофиламентами. Макрофаги фагоцитируют чужеродный материал и клеточно-тканевый детрит, стимулируют и регулируют иммунный ответ, индуцируют воспалительную реакцию, участвуют в репаративных процессах и обмене компонентов внеклеточного матрикса. Многообразие осуществляемых функций объясняет экспрессию этими клетками большого числа рецепторов, связанных с плазматической мембраной, внутриклеточных и секретируемых.

Макрофаги входят в систему мононуклеарных фагоцитов. Система мононуклеарных фагоцитов это физиологическая защитная система клеток, обладающих способностью поглощать и переваривать чужеродный материал. Клетки, входящие в состав этой системы, имеют общее происхождение, характеризуются морфологическим и функциональным сходством и присутствуют во всех тканях организма. Критериями принадлежности к этой системе считают способность к активному пиноцитозу и иммунному фагоцитозу, способность прилипать к стеклянным поверхностям и происхождение из промоноцитов костного мозга. При цитологическом исследовании макрофагов первым и важнейшим этапом становится их правильное выделение из материала. Методика выделения может значительно варьироваться исходя из типа изучаемого органа. В последующем необходимо изготовить мазки, окрасить их методикой, позволяющей оценить тот или иной компонент клетки (например, окраска на пероксидазу, активность лизосом и т.д.). Полученные результаты оцениваются полуколичественным методом, с вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Приступая к микроскопии, в каждом отдельном мазке при обзорном просмотре выбирают эталоны – клетки, содержащие исследуемое вещество. Отсутствие окраски цитоплазмы принимается за нулевую степень. Наличие в цитоплазме небольшого окрашенного участка, составляющего 1/4 часть всей цитоплазмы, соответствует интенсивности реакции 1-й степени (А). Окрашивание 8/10 цитоплазмы принимается за 2-ю степень насыщения (В). При 3-й степени интенсивности реакции исследуемое вещество заполняет всю цитоплазму и даже выявляется на ядре. Затем, как при подсчете лейкоцитарной формулы, в разных участках мазка подсчитывают, не пропуская, 100 однотипных клеток и рассчитывают процентное содержание клеточных элементов с различной интенсивностью реакции. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) вычисляется по формуле (по Карлов):

$$\text{СЦК} = 3C + 2B + A$$

При вычислении показателя активности, клетки с интенсивностью 0 исключаются; к проценту клеток с интенсивностью 1 (А) прибавляется процент клеток с интенсивностью 2 (В), умноженный на коэффициент 2 и количество клеток с

интенсивностью 3 (С), умноженное на коэффициент 3. Показатель активности в условных единицах от 0 до 300, СЦК 0–3%.

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации

Критерием успешности освоения учебного материала **по окончанию учебного семестра** (промежуточная аттестация) является экспертная оценка преподавателя, учитывающая: текущую успеваемость в течение семестра (контрольные работы, опрос-демонстрация, опрос, слайд-сообщение), выполнение и защита по контрольным вопросам лабораторных работ и оценка, полученная на зачете. Процедура зачета: зачет проводится по билетам. Билет состоит из 2 вопросов, на каждый из которых необходимо дать полный, развернутый ответ. После подготовки студента проводится опрос по содержанию вопросов билета.

Кроме того, экспертная оценка преподавателя может основываться на регулярности посещения обязательных учебных занятий, успешности выполнения установленных на данный семестр объемов рабочей программы.

4.2. Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств

4.2.1. Критерии оценивания опроса

Оценка «отлично» ставится, если студент дал полный ответ и показал глубокие теоретические знания по каждому из вопросов.

Оценка «хорошо» ставится, если студент дал полный ответ, но допускает неточности.

Оценка «удовлетворительно» ставится, если студент знает основной материал по каждому вопросу, но допускает многочисленные неточности.

Оценка «неудовлетворительно» ставится, если студент не знает материал задаваемых вопросов или имеет поверхностные знания по всем вопросам.

4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций

При подведении итогов учитываются результаты текущей аттестации.

Особенности проведения процедуры оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья обозначены в рабочей программе дисциплины (модуля).

«1 уровень» - ознакомление (иметь общее представление, узнавать);

«2 уровень» - понимание учебного материала, излагаемого в учебнике, методической разработке или преподавателем;

«3 уровень» - умение логично, последовательно, достаточно полно и точно излагать изученный материал;

«4 уровень» - творчески использовать полученные знания.

Для удовлетворительной (положительной) оценки знаний требуется минимум 3-й уровень усвоения учебного материала.

Требования (критериальные показатели) к уровню освоения дисциплины

Результат зачета	Требования к знаниям
Зачтено	<p>Студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи, предложения. Делает выводы; логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально-личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер. Допущенные ошибки исправляются студентом после дополнительных вопросов экзаменатора.</p> <p>Учитывается участие в дискуссиях на практических и семинарских занятиях, уровень ответов на контрольные вопросы, написания тестовых заданий и защита докладов.</p>
Не зачтено	<p>студент обнаруживает знание и понимание основных положений учебного материала, но излагает его неполно, непоследовательно, допускает неточности и существенные ошибки в определении понятий, формулировке положений, не привлекает для аргументации ответа основные положения исследовательских, концептуальных и нормативных документов, не умеет обосновать свои суждения; наблюдается нарушение логики изложения. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности, не содержит собственной профессионально-личностной позиции.</p> <p>Или, студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений, искажающие их смысл; не ориентируется в нормативно-концептуальных, программно-методических, исследовательских материалах, беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет соединять теоретические положения с педагогической практикой; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает межпредметные связи.</p> <p>Учитывается участие в дискуссиях на практических и семинарских занятиях, уровень ответов на контрольные вопросы и написания тестовых заданий.</p>

**Направление 06.03.01 Биология направленность (профиль) Биология, РПД:
"Гистохимические методы исследования", год набора 2025, форма обучения очная**

Фонд оценочных средств дисциплины (модуля) одобрен и рекомендован:

Проректор по учебной работе утверждено 24.02.2025 А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Председатель Ученого совета
биологического факультета

согласовано

Д.С. Сташкевич

Заседанием кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Заведующий кафедрой

согласовано

А. Л. Бурмистрова

Автор (составитель)

Г. В. Брюхин

**Структура рабочей программы соответствует приказу ректора ФГБОУ ВО
«ЧелГУ» от «13» апреля 2021 г. № 247-1**