

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ОСНОВЫ МЕДИЦИНСКОЙ ЦИТОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие для вузов

Составители:
О.С. Машкина, А.В. Кокина,
В.Н. Попов

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ЗАНЯТИЕ 1. Световая микроскопия: устройство, типы, оптические дан- ные, правила работы с микроскопом.....	5
ЗАНЯТИЕ 2. Единство и разнообразие клеточных типов.....	10
ЗАНЯТИЕ 3. Способы изготовления препаратов для световой микроскопии.	12
ЗАНЯТИЕ 4. Техника приготовления препаратов мазков крови животных	16
ЗАНЯТИЕ 5. Анализ препаратов крови лабораторной крысы и человека. Определение лейкоцитарной формулы.....	18
ЗАНЯТИЕ 6. Методы контрастирования в световой микроскопии. Конфо- кальный микроскоп для цитологических исследований.....	21
ЗАНЯТИЕ 7. Методы исследования химического состава и метаболизма клеток и тканей.....	25
ЗАНЯТИЕ 8. Измерение микроскопических объектов.....	29
ЗАНЯТИЕ 9. Электронная микроскопия как метод цитологических иссле- дований.....	31
ЗАНЯТИЕ 10. Ультраструктурная (субклеточная) организация клетки.....	37
ЗАНЯТИЕ 11. Ядро интерфазной клетки.....	43
ЗАНЯТИЕ 12. Структура митотических хромосом. Понятие о кариотипе...	48
ЗАНЯТИЕ 13. Кариотип человека и методы его изучения. Денверская и Парижская классификация хромосом человека.....	52
ЗАНЯТИЕ 14. Изучение кариотипа человека и диагностика наследствен- ных заболеваний с использованием современных молекулярно- цитогенетических методов.....	59
ЗАНЯТИЕ 15. Половой хроматин и его использование для диагностики пола и аномалий в системе половых хромосом.....	63
ЗАНЯТИЕ 16. Митоз – универсальный способ деления эукариотических клеток.....	65
ЗАНЯТИЕ 17. Клеточный цикл и его регуляция. Нарушение клеточного цикла и онкогенез.....	69
ЗАНЯТИЕ 18. Политенные хромосомы как результат «сбоя» клеточного цикла.....	76
ЗАНЯТИЕ 19. Патологии митоза и их последствия. Полиплоидия и анеуп- лоидия.....	79
ЗАНЯТИЕ 20. Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости для оценки состояния генетического аппарата человека.....	83
ЗАНЯТИЕ 21. Деление клетки – мейоз. Типы мейоза.....	86
ЗАНЯТИЕ 22. Формирование половых клеток у человека: сперматогенез и оогенез.....	92
ЗАНЯТИЕ 23. Патологии мейоза и их последствия.....	99
ЗАНЯТИЕ 24. Нарушения кариотипа человека, связанные с анеуплоидией. Хромосомные болезни и их цитодиагностика.....	102
ЗАНЯТИЕ 25. Решение ситуационных задач.....	106
ЗАНЯТИЕ 26. Апоптоз и некроз – два варианта гибели клеток.....	108
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	113

венном освещении). Для лучшего освещения объекта в биологических микроскопах вместо зеркала используют как вынесенные перед микроскопом (ОИ-19), так и встроенные в микроскоп осветители (у микроскопов МБИ-6, МБИ-11, Микмед 2 (рис. 2), Primo-Star).

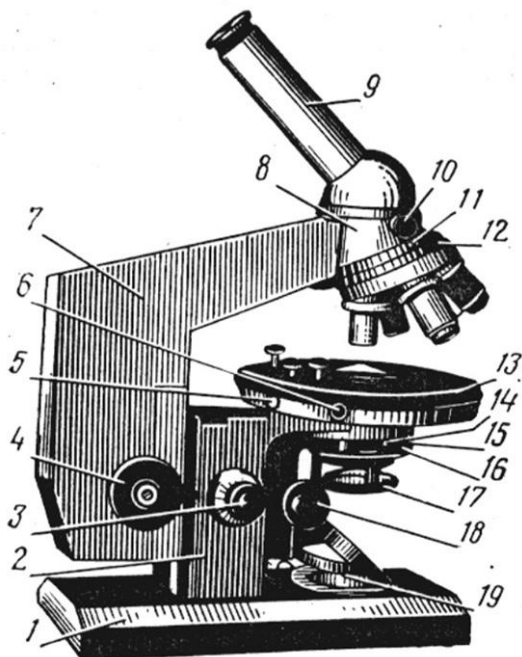


Рис. 1 - Устройство микроскопа "Биолам Р" с зеркалом: 1 - основание; 2 - коробка с механизмом микрометрической фокусировки; 3 - рукоятка микрометрической фокусировки; 4 - рукоятка макрометрической фокусировки; 5 - стопорный винт; 6 - центрировочный винт; 7 - тубусодержатель; 8 - головка; 9 - монокулярная насадка; 10 - винт крепления насадки; 11 - винт револьвера; 12 - револьвер; 13 - предметный столик; 14 - винт конденсора; 15-16 - корпус конденсора; 17 - откидная линза в оправе; 18 - рукоятка конденсора; 19 - зеркало

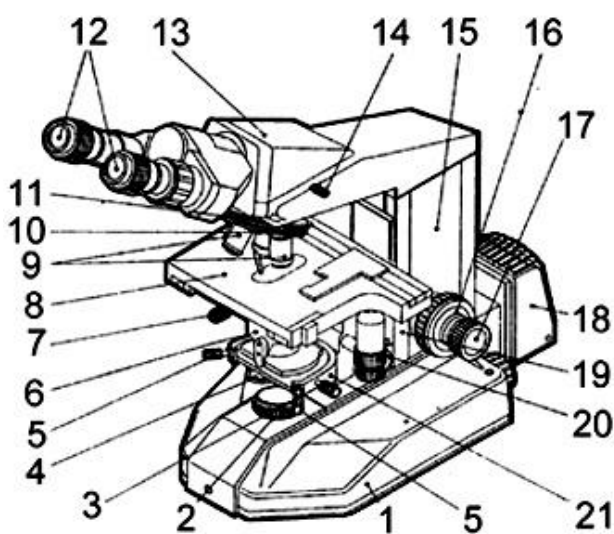


Рис. 2 - Устройство микроскопа Микмед 2 со встроенным осветителем: 1 - основание; 2 - кольцо полевой диафрагмы; 3 - винт крепления конденсора; 4 - откидная оправа; 5 - винты, центрирующие конденсор; 6 - конденсор; 7 - винт крепления предметного столика; 8 - предметный столик; 9 - объективы; 10 - револьверное устройство; 11 - рифленое кольцо револьверного устройства; 12 - окуляры; 13 - бинокулярная насадка; 14 - винт крепления бинокулярной насадки; 15 - штатив; 16 - рукоятка грубой (макрометрической) фокусировки; 17 - рукоятка тонкой (микрометрической) фокусировки; 18 - фонарь; 19 - кронштейн столика; 20 - рукоятка перемещения конденсора; 21 - кронштейн

Объективы – многолинзовые системы, одна из наиболее важных частей микроскопа, определяющая его основные возможности. Объективы бывают сухие и иммерсионные. Сухие объективы (7^{\times} , 9^{\times} , 20^{\times} , 40^{\times}) применяются обычно при небольших увеличениях (от 56 до 600 раз). В этом случае

между объективом и препаратом находится слой воздуха (показатель преломления его 1). Из-за разницы показателей преломления предметного стекла и воздуха часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. Поэтому сухие объективы не позволяют рассматривать слишком мелкие объекты, для этого используют иммерсионные объективы, дающие увеличение в 900-1350 раз. Преимущество иммерсионной системы заключается в том, что между объектом на предметном стекле и объективом находится среда с одинаковым показателем преломления (кедровое масло имеет показатель преломления 1,515; вода – 1,33). Благодаря тому, что лучи не преломляются и попадают в объектив, достигается наилучшее освещение и хорошая видимость мельчайшего объекта.

На оправе иммерсионных объективов имеются канавки разного цвета в зависимости от вида применяемой иммерсии. На объективе масляно-иммерсионном (“МИ” на оправе) канавка окрашена в черный цвет. В качестве иммерсии используют вазелиновое, кедровое или другое масло. На объективе водно-иммерсионном (“ВИ”) канавка белая. Этот объектив удобен для изучения объектов, заключенных в воду. На объективе глицериново-иммерсионном (“ГИ”) канавка окрашена в желтый цвет.

Увеличение объектива указано на оправе. Например, у микроскопа МБР-1 объективы могут иметь увеличение 9^{\times} , 20^{\times} , 40^{\times} , 90^{\times} и апертуру соответственно 0,20; 0,40; 0,65; 1,25 (или 1,4).

Апертура (A) = нумерическая апертура (NA) – это величина, определяющая способность оптической системы воспринимать то или иное количество света (т.е. характеризует светособирающую способность объектива). Она определяется по формуле: $A = n \cdot \sin \alpha$, где α – половина угла линзы объектива, т.е. угла между лучами, идущими от объекта к краям объектива, а n – показатель преломления среды между покровным стеклом препарата и объективом. Если между препаратом и объективом находится воздух, то значение $n \cdot \sin \alpha$ может достигать 0,94-0,95. Величина нумерической апертуры является постоянной для каждого отдельного объектива и указана на его оправе. Иммерсионные объективы имеют более высокие значения апертуры, чем сухие, так как показатель преломления жидкости >1 . Так, сухой объектив с увеличением 40^{\times} имеет $A=0,65$, а водноиммерсионный объектив с тем же увеличением – $A=0,75$. Наиболее высокая апертура – у масляноиммерсионных объективов (до 1,4).

Апертурой характеризуются не только объективы, но и конденсор микроскопа. Их величины указываются на оправе объективов и конденсора и должны совпадать (принцип Келера). В противном случае возможности объектива реализуются не полностью.

Главной характеристикой микроскопа как оптической системы, определяющей ее качество, является *разрешающая способность*. Под *разре-*

шающей способностью объектива микроскопа (d) понимают тот наименьший диаметр частицы, которую мы можем увидеть в микроскоп.

Разрешающая способность невооруженного глаза человека равна примерно 0,1-0,2 мм или 100-200 мкм (1 мм = 1000 мкм). При помощи сильной лупы можно рассматривать объекты величиной до 0,01 мм (10 мкм). Световой микроскоп может повысить (к невооруженному глазу человека) разрешающую способность в 1000 раз. Обычно максимальная разрешающая способность микроскопа не выше 0,2-0,35 мкм или 200-350 нм (1 мкм=1000 нм - нанометров), т.е. в световом микроскопе можно видеть частицы размером 0,2-0,35 мкм.

Разрешающая способность объектива зависит от длины волны (чем она меньше, тем меньшего размера деталь мы можем увидеть) и от численной апертуры объектива – A (чем она выше, тем выше разрешение) и вычисляется по формуле: $d = \frac{\lambda \cdot 0,61}{A}$, где d – разрешающая способность

объектива; λ – длина волны используемого источника света, мкм; A – числовая апертура. Так, при использовании объектива масляно-иммерсионного с увеличением 90^{\times} и апертурой (A) =1,4, при освещении обычным светом $\lambda=0,55$ мкм, наименьший диаметр видимых частиц составляет $d = \frac{0,55 \text{ мкм} \cdot 0,61}{1,4} = 0,24 \text{ мкм}$. Уменьшая длину волны света (используя,

например, синие светофильтры – $\lambda=0,47$ мкм или коротковолновый ультрафиолетовый свет – $\lambda=0,26-0,28$ мкм) можно увидеть и изучить более мелкие структуры и детали строения, чем при освещении обычным белым светом.

Каждый объектив характеризуется определенной величиной *рабочего расстояния*. Объективы малого увеличения имеют максимальное рабочее расстояние от объектива до препарата и наибольшее поле зрения, поэтому с них начинают исследования, а затем переходят на объективы с большим увеличением. При работе с микроскопом важное значение имеет толщина покровного и предметного стекол. Качественное изображение наблюдается при толщине покровного стекла 0,17 мм, предметного – 1,2 мм.

Окуляр устроен значительно проще объектива. Нередко он состоит всего из двух линз. Увеличение окуляра у микроскопа обычно составляет 7^{\times} , 10^{\times} , 15^{\times} . Цифровые видеоокуляры, широко используемые в последние годы, позволяют вывести изображение на экран монитора и провести его компьютерную обработку, получить фотографии высокого качества.

Общее увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива ($V_{об}$) на увеличение окуляра ($V_{ок}$): $V = V_{об} \cdot V_{ок}$. Если объектив имеет увеличение 90^{\times} , а окуляр 15^{\times} , то общее увеличение равно 1350. В тех случаях, когда микроскоп снабжен бинокулярной насадкой АУ-

12, имеющей свое собственное увеличение (V_H), равное 1,5х, увеличение микроскопа определяют по формуле: $V = V_{об} \cdot V_{ок} \cdot V_H$.

Выбор окуляра в микроскопе должен производиться так, чтобы общее увеличение микроскопа не превышало величину 1000А, т.е. *предельную величину полезного увеличения микроскопа*. Например, при объективе 90х с апертурой 1,35 полезное увеличение микроскопа будет равно 1350 раз ($1000 \cdot 1,35$) и поэтому не рекомендуется применять окуляры с увеличением больше 15^x ($1350:90 = 15$). Если нарушить это правило и применить окуляры 20^x и более сильные, то в рассматриваемых структурах мы не увидим дополнительных деталей, наоборот, на контурах элементов объекта из-за явления дифракции будут заметны световые окаймления, что ухудшит изображение и даже может привести к оптическим ошибкам.

Правила обращения с микроскопом. Работая с микроскопом, нужно придерживаться следующих *правил*:

1. Микроскоп необходимо содержать в чистоте, предохранять от пыли и сырости, толчков и царапин, соприкосновения с кислотами, щелочами, растворителями, применяемыми при изготовлении микропрепаратов. В нерабочем состоянии микроскоп должен быть накрыт чехлом.

2. Особое внимание надо обращать на чистоту объективов и других оптических деталей. Нельзя касаться пальцами поверхностей линз. Оптические поверхности окуляров, объективов и конденсоров нужно периодически протирать марлей или мягкой салфеткой; чистой ватой, смоченной специальной жидкостью для чистки оптических деталей.

3. При работе с объективом *большого увеличения* тубус передвигать вначале макровинтом; окончательная фокусировка производится микровинтом. Микровинт во избежание порчи винтовой нарезки поворачивать не более, чем на один оборот в ту или другую сторону. При работе с объективом *малого увеличения* тубус передвигать только *макровинтом*.

4. Нельзя вынимать препарат из-под объектива большого увеличения. Это может привести к повреждению объектива и порче препарата.

5. Не оставлять микроскоп после работы на объективе большого увеличения; револьвер следует перевести на малое увеличение.

6. Не оставлять тубус микроскопа открытым, т.е. без окуляра, так как это приводит к накоплению в нем пыли и загрязнению объектива.

7. Перенос микроскопа осуществляется следующим образом: правой рукой захватывают тубусодержатель, а ножку штатива ставят на ладонь левой руки.

ВНИМАНИЕ! Запрещается самим разбирать объективы, окуляры, конденсор.

Материалы и оборудование. Различные марки световых микроскопов ("Биолам", МБР-3, МБИ-6, Микмед-2, Микмед-6, Primo-Star и др.), осветители, цифровые видеокамеры, готовые препараты.

Ход работы. **Задание 1.** Ознакомиться с устройством, типами и основными характеристиками оптической системы световых монокулярных, бинокулярных и тринокулярных микроскопов (“Биолам”, МБР-3, МБИ-6, Микмед-2, Микмед-6, Primo-Star).

Задание 2. Установить микроскоп в рабочее положение. Определить общее увеличение микроскопа, используя комбинацию из объективов и окуляров с разным увеличением.

Задание 3. Вычислить значение разрешающей способности микроскопа при использовании низкоапертурных и высокоапертурных объективов и освещении объекта лучами с длиной волны 0,55 мкм и 0,47 мкм. Полученные результаты занести в табл. 1. Сделать вывод при использовании каких объективов и при каком освещении наиболее высокая разрешающая способность.

Т а б л и ц а 1

Разрешающая способность микроскопа при освещении объекта лучами длиной волны 0.55 мкм и 0.47 мкм, использовании различных объективов

Сравниваемые объективы	Объектив		Разрешающая способность при длине волны (λ), мкм	
	увеличение	апертура (A)	$\lambda = 0.55$ мкм	$\lambda = 0.47$ мкм
1	40 ^x	0,65		
	90 ^x	1,4		
2	40 ^x	0,65		
	40 ^x	0,75		
3	60 ^x	1,2		
	90 ^x	1,4		

Задание 4. Ознакомиться с возможностями использования цифровых видеокамер для регистрации изображений.

ЗАНЯТИЕ 2. Единство и разнообразие клеточных типов

Цель занятия: 1. Ознакомление с основными типами организации клеток (прокариотические и эукариотические), единством и разнообразием клеточных типов у эукариот. 2. Изучить сходства и отличия строения животной и растительной клетки. 3. Показать многообразие морфологии клеток животных и человека и ее связь с выполняемыми функциями.

Основные теоретические положения.

Клетка – элементарная (наименьшая) единица строения, функционирования, развития и воспроизведения живых организмов. Существует два основных типа клеток, различающихся по организации генетического материала: прокариотические (доядерные) и эукариотические (собственно ядерные). Прокариоты (бактерии, цианобактерии и микоплазмы) - преимущест-