

Министерство просвещения Российской Федерации  
ФГБОУ ВО «Уральский государственный педагогический университет»  
Институт естествознания, физической культуры и туризма  
Кафедра биологии, химии, экологии и методики их преподавания

**Элективный курс «Цитохимические реакции»**

Выпускная квалификационная работа

Квалификационная работа  
допущена к защите  
Зав. кафедрой  
Н.Л. Абрамова

Исполнитель:  
Попова Оксана Алексеевна,  
обучающийся группы БХ-1701,  
очного отделения

\_\_\_\_\_

дата

\_\_\_\_\_

подпись

\_\_\_\_\_

подпись

Научный руководитель:  
Филинкова Т. Н.,  
канд. биол. наук, доцент

\_\_\_\_\_

подпись

Екатеринбург 2022

## Содержание

<b>Введение .....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1. Цитохимические методы .....</b>	<b>7</b>
1.1. Первичная подготовка материала .....	7
1.2. Приготовление и фиксация мазков.....	9
1.3. Подготовка срезов .....	11
1.3.1. Условия приготовления срезов.....	13
1.3.2. Снятие, перенос и фиксация срезов .....	13
1.3.3. Химическое обезвоживание и заливка материала .....	15
1.3.4. Лиофильная сушка и заливка материала .....	16
1.4. Окрашивание цито- и гистохимических материалов .....	19
1.5. Качественные анализы методов исследования .....	22
1.5.1. Белки .....	22
1.5.2. Нуклеиновые кислоты .....	29
1.5.3. Углеводы.....	33
1.5.4. Липиды.....	34
1.6. Количественные анализы цитохимических методов исследования ...	36
<b>Глава 2. Формы организации учебного процесса деятельности учащихся в процессе изучения цитохимических реакций .....</b>	<b>41</b>
2.1. Лабораторные работы, как метод обучения.....	41
2.2. Принципы организации лабораторных работ .....	43
2.3. Применение электронных образовательных ресурсов при изучении элективного курса «Цитохимические реакции» .....	46
<b>Глава 3. Элективный курс «Цитохимические реакции».....</b>	<b>48</b>
3.1. Понятие элективного курса.....	48
3.2. Программа элективный курс «Цитохимические реакции» .....	50
3.2.1. Пояснительная записка .....	50
3.2.2. Планируемые результаты освоения элективного курса.....	53
3.2.3. Содержание элективного курса .....	56
3.2.4. Методическая литература по изучению элективного курса «Цитохимические реакции».....	60
3.3. Урок «История формирования и этапы развития цитологии» .....	61
3.4. Методические указания к лабораторной работе по цитохимическим реакциям.....	73

3.4.1. Лабораторная работа №3 «Биуретовая и ксантопротеиновая реакции по определению белков» .....	73
3.4.2. Лабораторная работа №4 «Кислотный гидролиз дрожжей и определение состава нуклеиновых кислот» .....	76
<b>Заключение</b> .....	<b>79</b>
<b>Список источников</b> .....	<b>83</b>
<b>Приложение 1</b> .....	<b>87</b>
<b>Приложение 2</b> .....	<b>89</b>
<b>Приложение 3</b> .....	<b>91</b>

## Введение

Цитохимические методы исследования - микроскопические методы исследования, позволяющие проводить анализ химического состава клетки и локализации в ней исследуемых органических веществ клетки. Данные методы исследования применяют для анализа только отдельных клеток или их групп, причем цитохимические методы исследования обладают большей чувствительностью. От биохимических методов цитохимические методы исследования отличает возможность точно определить локализацию исследуемых веществ. Рассматривается основная база, от пребывания исследуемого материала еще в живом организме до конечного этапа перед детальным рассмотрением всех его химических веществ. Основы для создания и определения жизненно важных исследований, а также помощь в дальнейшем их описании.

Цитохимия широко используется в настоящее время. Разработано громадное количество окрасочных приемов, позволяющие выявлять белки, нуклеиновые кислоты, жиры и углеводы входящие в состав живых клеток. Данные методы основаны на проведение химических реакций. Отдельные компоненты и целые структуры органических соединений взаимодействуют с определенными красителями, которые подбираются индивидуально и свидетельствуют о своем наличии и количестве в исследуемых образцах.

Науки биология и медицина имеют бурное развитие и ведут интенсивную работу по изучению нового материала. Именно цитохимические методы исследования давно занимают важнейшее место в этих науках и широко используются для решение самых распространенных вопросов теоретического и практического характера. Благодаря данным методам, рассматривают изменения, происходящие в клетки и тканях, при нормальных или патологических процессах. Только благодаря, данным методам можно определить различные специализированные функции клеток и тканей,

которые так необходимы в нынешней медицине. Расширить возможность наук, в которых применимы цитохимические методы.

Целью выпускной квалификационной работы является методика изучения цитохимических реакций в лабораторной деятельности учащихся с применением электронных образовательных ресурсов в разработанном элективном курсе.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- 1) по литературе рассмотрено подготовка мазков и срезов для цитохимических реакций;
- 2) по литературе рассмотрены методы оценки цитохимических реакций, с обнаруженными в них исследуемыми органическими веществами;
- 3) определить электронных образовательных ресурсов и лабораторные формы организации учебного процесса для лучшего изучения цитохимических реакций в школьном курсе;
- 4) разработать элективный курс, включающий в себя изучение цитохимических методов на примере органических соединений живых клеток и значимости цитохимии в современной биологии и медицине;
- 5) разработка урока элективного курса и его апробация в средней общеобразовательной школе;
- 6) разработка лабораторных работ применяемых при изучение элективного курса «Цитохимические реакции».

Объект исследования: Внеучебный процесс в средней общеобразовательной школе.

Предмет исследования: Организация изучения в школе цитохимических реакций по обнаружению органических веществ клеток.

Основной текст курсовой работы изложен на 91 страницах машинописного текста, выпускная квалификационная работа включает введение, три главы, заключение, список используемой литературы, приложение.

## Глава 1. Цитохимические методы

### 1.1. Первичная подготовка материала

Прежде чем приступить к рассмотрению подготовки материала, для дальнейшего его исследования, необходимо ознакомиться с самими понятиями цито- и гистохимических методов исследования, для понимания работы. К цитохимическим методам относятся способы идентификации в цитологических препаратах химических веществ. Цитохимия, как направление гистохимии, изучает химическую природу клеточных структур, распределение химических соединений внутри клетки и их превращения в связи с функцией клетки и ее отдельных компонентов [25]. Цитохимические методы исследования проводят в препаратах на химические цветные реакции, определяющих в клетках характерные вещества и ферменты.

Гистохимические методы исследования используются для определения химических веществ в гистологических срезах. Для проведения гистохимических исследований необходима строгая прижизненная локализация изучаемого химического соединения, что возможно лишь при сохранении структуры тканей и клеток как в живом организме. С помощью разнообразных гистохимических методов можно судить не только об особенностях химических реакций различных тканевых структур, но и определять характер и темп обмена в тканях и клетках [11]. Требование точной сохранности структуры как основной предпосылки всякого цитохимического выявления веществ означает, что гистохимия не может использовать химические методы, ведущие к сильным изменениям структуры [16]. При ознакомлении с понятиями становится ясно, что цитохимия является частью гистохимии. Они составляют единое целое и отражают единство функционального и структурного.

Подготовка клеток для цитохимических исследований, так как при ее проведении не требуется специальная аппаратура, в отличие от

гистохимических методов. В изучение цитохимических методов исследование важно получение полноценного материала. По способу получения цитохимического материала можно подразделить на дооперационную (эксфолиативную, абразивную, аспирационную) и интраоперационную.

1. Эксфолиативная цитохимия отличается простотой техникой получения большого количества различного типа клеток, в том числе воспалительного ряда. Клеточный материал может быть не очень хорошо сохранен. Для получения информативного материала с поверхности удаляют гнойные массы, корочки, некротический налет. Если полученный материал представляет жидкость, то в нее добавляется цитрат натрия, чтобы жидкость не свернулась.
2. Абразивный материал получают из определенного участка внутренних органов, в том числе исследуются субэпителиальные поражения с помощью фиброоптических инструментов. При таком взятии материала клетки хорошо сохраняются, и препараты легко интерпретировать.
3. Аспирация клеток проводится с помощью шприца и полый иглы их дальнейшее микроскопическое изучение после специальной подготовки. Данный прием используется очень широко.
4. Интраоперационное цитохимическое исследование. Результат исследования может быть получен в более короткие сроки, чем гистологический анализ криостатных срезов, при этом точность обоих методов сопоставима [23].

Материал для цитохимических исследований нельзя разделять на части, так как свойственные изменения могут быть в одной части материала и не быть в другой. Из отобранного материала, для дальнейшего исследования, готовят мазки или срезы. Однако технически цитохимические

методы достаточно быстры и просты, но все же имеет свои трудности в формулировки заключения [25].

Первый и самый важный компонент, это подготовка материала для исследования. Она играет решающую роль для дальнейшего результата в цито- и гистохимических исследованиях. Главной задачей данного компонента заключается в том, что необходимо сохранить прижизненные вещества в клетках и тканях, таким образом, при котором можно будет судить об их состоянии.

## 1.2. Приготовление и фиксация мазков

В цитохимических исследованиях для изучения химических реакций в клетках из материала готовят мазки. Имеются конкретные принципы изготовления мазков из биологического материала. Методика правильного приготовления мазка должна отвечать следующим условиям:

1) мазок должен начинаться на 1 см от узкого края предметного стекла и заканчиваться примерно в 1,5 см от другого края предметного, мазок не должен достигать длинного края стекла, между мазком и краем предметного стекла должно оставаться расстояние примерно 0,3 см;

2) хороший мазок должен быть максимально тонким (максимально приближающимся к однослойному), равномерной толщины (не волнообразным) на всем протяжении;

3) мазок из осадка жидкого материала (жидкость из серозной полости, смыв из различных органов, содержимое кистозной полости и т. п.) должен заканчиваться у одного из узких краев предметного стекла в виде следа, оставленного как бы тонкой щеткой;

4) клетки в мазке должны быть равномерно распределены, все участки мазка должны хорошо просматриваться и не содержать "толстые участки",

содержащие не просматриваемые (плохо просматриваемые) скопления или комплексы клеток [23].

Правила фиксации мазка. Фиксация мазка ведется в соответствии технологии, обусловленной биологическим материалом, взятым для цитохимического исследования (влажная фиксация биологического материала или подсушивание его на воздухе). При недостаточной фиксации исследуемого мазка происходит некачественное окрашивание клеток.

1. Правильная фиксация мазка обуславливает стойкость клеток по отношению к содержащейся в красках воде, которая в нефиксированном мазке изменяет строение клеточных элементов. При фиксации мазка происходит коагуляция белка, в результате чего клетки прикрепляются к предметному стеклу.

2. При фиксации цитологических препаратов должны использоваться фиксаторы, приготовления которых приводятся в соответствующих руководствах.

3. Рекомендуемые фиксаторы - метиловый спирт, этиловый спирт, смесь Никифорова, фиксатор Май-Грюнвальда, фиксатор Лейшмана, ацетон (для иммуноцитохимии). Лучшим фиксатором является метиловый спирт, на основе которого готовят фиксатор Лейшмана и Май-Грюнвальда [23].  
Исправить по розовому.

Например, для химической фиксации используются стеклянные предметы (пробирки, предметные стекла и т.д.). Общей фиксирующей жидкости необходимо брать в 20-30 раз больше объема исследуемого кусочка материала. Фиксирование производится без доступа света и при определенной температуре. Оптимальная температура фиксации материала 37°C, если она будет выше, то процесс будет ускорять фиксацию. Продолжительность фиксации составляет от нескольких часов до одних суток и более в зависимости от свойств фиксатора и характера исследуемого материала. Фиксаторы подразделяются на простые- 10-20% раствор

формалина, 96° спирт и 100°спирт(абсолютный спирт), 1-2% раствор осмиевой кислоты и другие, и сложные- спирт-формол (100 мл спирта 70° и 2-5 мл формалина), жидкость Ценкера (5 г сулемы, 1 г сернокислого натрия, 2,5 г двуххромовокиолого калия, 100 мл дистиллированной воды и 5 мл ледяной уксусной кислоты) и другие [34].

### 1.3. Подготовка срезов

В гистохимических методах исследования для изучения способов подготовкой срезов из материала, необходимо сначала ознакомиться с техникой, на которой их изготавливают. Так как в гистохимическом методе важна сохранность прижизненного состояния изучаемых тканей. Методы по получению свежих срезов из тканей можно разделить на две большие группы методы с использованием ножа глубокого охлаждения и метод с применение криостата.

Микротомы – это приборы, с помощью которых получают срезы тканей, залитых в различные среды, а также замороженных и нефиксированных. Для получения гистологических срезов применяют специальные микротомные ножи, различающиеся по форме, длине и углу сечения лезвия [19]. Согласно принципу воздействия отличают санные, замораживающие, ротационные микротомы. Охлаждение лезвия ножа в замораживающем микротоме струей углекислоты. Такой микротом приготавливает неполные серии срезов для гистохимического исследования. Несовершенство и затруднения, возникающие при работе данного микротомы, заставили разработать более улучшенные конструкции. Простой санный микротом с ножом, непрерывно охлаждаемым сухим льдом (твердой CO<sub>2</sub>). Сухой лед помещался на поверхность ножа и удерживался планками, прикрепленными по обеим сторонам режущей поверхности. Получение более успешных срезов проводятся с помощью ножа глубокого охлаждения, при

использовании несколько переоборудованного ротационного замораживающего микротом. Срезы получаются толщиной 6-8 мм, почти не нарушая серийности [25].

В связи со скоротечным развитием гистохимических ферментов стали использовать усовершенствованный метод получения срезов с помощью охлажденного микротом. Резка замороженного материала производится в специальном приборе. Криостат – специализированная холодильная камера с установленным в ней микротомом, в котором имеются отверстия для рук, люминесцентная лампа и смотровое стекло [19]. Криостат отличается от ножа глубокого охлаждения, тем, что при приготовлении срезов с помощью ножа, не применяют внешний источник холода, так что и ткани, и нож имеют одинаковую температуру. Таким образом, нож глубокого охлаждения в холодной среде практически нужно рассматривать как криостат. Данный прибор предназначен для работы при температуре - 16°C до - 18°C, хотя в некоторых камерах можно получать температуру до - 30°C. В боковые стенки криостата для работы на микротоме встроены рукава с перчатками. Внутри он освещен, так же снабжен вентилятором для создания циркуляции воздуха при изготовлении срезов. Под окошком расположена дверца, дающая доступ в камеру. Для изготовления хороших тонких срезов в криостате необходимо хорошее состояние лезвия ножа и регулировка положения антироллерной пластинки [25].

Срезы, изготовленные в криостате, необходимы для выявления ферментов, а также в осуществлении других методов, при которых используются фиксированные срезы. Все срезы должны выполняться при оптимальных условиях.

### 1.3.1. Условия приготовления срезов

Для изготовления качественного среза необходимо соблюдать определенные условия, так было выяснено, что оптимальная температура для ножа, камеры и тканевого блока зависит от вида ткани. Однако резка возможна при колебании температуры в широких пределах.

Температура ткани зависит от температуры блока, если он ниже - 45° ткань становится хрупкой и крошится так, что ее нельзя резать. При температуре блока от - 40° до -15° удается делать тонкие срезы, но отмечается сопротивление во время резки, а некоторые срезы крошатся на ноже. При более высокой температуре, до -5°, можно получать тонкие серийные срезы. Температура камеры должна быть от 0 до -10°. При температуре ниже -10° качество срезов начинает ухудшаться. Общим правилом при получении замороженных срезов является следующее положение: чем выше температура ножа, тем ниже должна быть температура блока [25]. Дальнейшим важным этапом в подготовки среза к изучению является его снятие с ножа после резки.

### 1.3.2. Снятие, перенос и фиксация срезов

Метод, удовлетворяющий в одном случае, может не дать нужных результатов в другом. Существует восемь, различных методов обработки срезов, полученных при помощи ножа глубокого охлаждения или охлажденного микротомата:

- 1) срезы снимают на теплое (равное комнатной температуре) или холодное (равное температуре криостата) покровное или предметное стекло. Фиксируя в момент таянья или погружения в холодную «защитную среду»;

- 2) срезы снимают на теплое или холодное покрывное или предметное стекло, дают ему оттаять и подсушивают на воздухе;
- 3) срезы снимают на теплое или холодное покрывное или предметное стекло, дают ему оттаять, подсушивают и далее фиксируют;
- 4) срезы снимают на какой-либо материал, отличающийся от стекла;
- 5) срезу переносят в теплую или холодную инкубационную среду;
- 6) срезу переносят в теплый или холодный раствор реактива;
- 7) срезы переносят в теплый или холодный фиксатор;
- 8) срезу подвергают лиофильной сушки.

Самыми распространенными и практичными являются первые три метода. При выборе метода следует опираться на практическое соображение, так как не один из них не является идеальным и имеет свои недостатки. Вырезанные кусочки ткани непосредственно с лезвия ножа погружают в фиксатор. Недопустимы сдавливания кусочков, промывание их водой, а также очистка поверхности органа. После погружения кусочков в сосуд с фиксатором туда же опускают этикетку с номером (шрифтом), написанным карандашом или тушью на матовой поверхности фотобумаги [19]. Фиксаторы уплотняют структуры исследуемого материала, по механизму денатурирования тканевой структуры и стабилизации липидов. Правильно подобранный фиксатор играет важную роль в исследовании, так как он приводит к изменениям структуры и объема тканей. Фиксаторы представляют собой простые (формалин, этиловый спирт, ацетон) и сложные (составные части простых фиксаторов, например, жидкость Буэна) растворы и токсичные вещества.

Цитохимические и гистохимические методы хоть и являются единым структурным целым, но при детальном рассмотрении процесса приготовления материала для исследования они отличаются. При цитохимических методах исследования из клетки изготавливают мазки, для дальнейшего рассмотрения, а в процессе гистохимического исследования

необходимы, срезы, приготовленные из тканей на специальной аппаратуре. Дальнейший анализ и проведение химических реакций у этих методов схожи, что и обуславливает их единство.

### 1.3.3. Химическое обезвоживание и заливка материала

Обезвоживание и заливка мазков и срезов является необходимым, для дальнейшего изучения химических реакций, протекающих в них. Общим для цитохимических и гистохимических методов исследования является химическое обезвоживание и заливка.

Существуют разные способы данной технологии, все зависит от того в каком фиксаторе находилась исследуемая ткань. Самым распространенным является обезвоживание в спиртах восходящей концентрации. Посредством проведения исследуемого материала через спирты возрастающей крепости 50° (1 час), 60° (1 час), 70° (2 часа), 80°(1 час), 90° (две смена по 30 минут), 96° (оставляют на ночь), 100° (две смены по 30 минут). Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах в среднем 48 часов в зависимости от качества материала (содержания жира в ткани) и размера кусочков, а также от их количества. Обезвоживание ткани выполняется постепенно, для того чтобы не случилось сморщивания [19].

С целью извлечения не толстых цитохимических и гистохимических мазков и срезов, необходимо уже обезвоженные клетки и ткани залить плотной средой, заранее пропитав ею кусочки материала. Заливочные среды бывают двух типов - растворимые в органических растворителях (парафин, целлоидин и др.) и водорастворимые (желатин, полиэферы и т.д.) [19]. Недостаток данного способа в том, что происходит смещение и потеря вещества из ткани, а также коагуляции белков.

### 1.3.4. Лиофильная сушка и заливка материала

Такой процесс сушки характерен только для гистохимических срезов. Его совершенством является то, что отсутствует потребность в фиксации и химическом разбавлении структур исследуемого материала, что иногда приводит к изменениям структур. При помощи быстрого замораживания ткани - важнейшего этапа лиофильной сушки - достигается полная остановка всех жизненных процессов и стабилизация структуры ткани. Химических и морфологических изменений при этом не происходит [16]. Заморозка кусков материала выполняется в надлежащей жидкости, которую лучше в целом охладит до температуры, около  $-160^{\circ}\text{C}$ . Благодаря чему, добивается моментальная и довольно полная заморозка воды в ткани. Значение данного действия в остановке химических реакций, которые наступают в исследуемых тканях после их удаления из организма. Так же в момент перехода ткани в твердое состояние, сильно возрастает ее вязкость, которая немедленно уменьшает совершающуюся в ней диффузию веществ до нуля. Недостатком в замораживание является образование кристаллов льда из свободной воды, содержащиеся в цитоплазме клеток и тканевых пространствах. Так же дальнейшее осаждение растворенных в этой воде веществ на границах ледяных кристаллов. Размеры кристаллов изменчивы, большие кристаллы льда, способные испортить текстуру замороженного материала, а также сходство лиофилизированной клетки с оригиналом будет меньше. Формирование множественных малых, одинаково распределенных кристаллов льда, напротив, содействует сохранению структуры и приближается к исходной структуре объекта [25]. Далее следует высушивание замороженной ткани.

Процесс высушивания состоит из двух фаз основное высушивание и заключительное высушивание. В процессе основного высушивания сублимируется вода, находящаяся в ткани в виде кристаллического льда (98-99% всей воды ткани). Остатки влаги (2-4%) удаляются заключительным

высушиванием при повышенной температуре [16]. Исследования выявили то, что отсутствует потребность стараться к абсолютному удалению влажности, так как наличие 1-2% вода в исследуемом материале никак не препятствует заливке. Помимо этого, конкретные доли воды в макромолекулах, к примеру, в белках и нуклеиновых кислотах, нужны с целью сбережения макромолекулярной структуры. Однако в ходе сушки вода имеет определенную динамику эффективности, которую можно представить в виде кривой (рис.1).

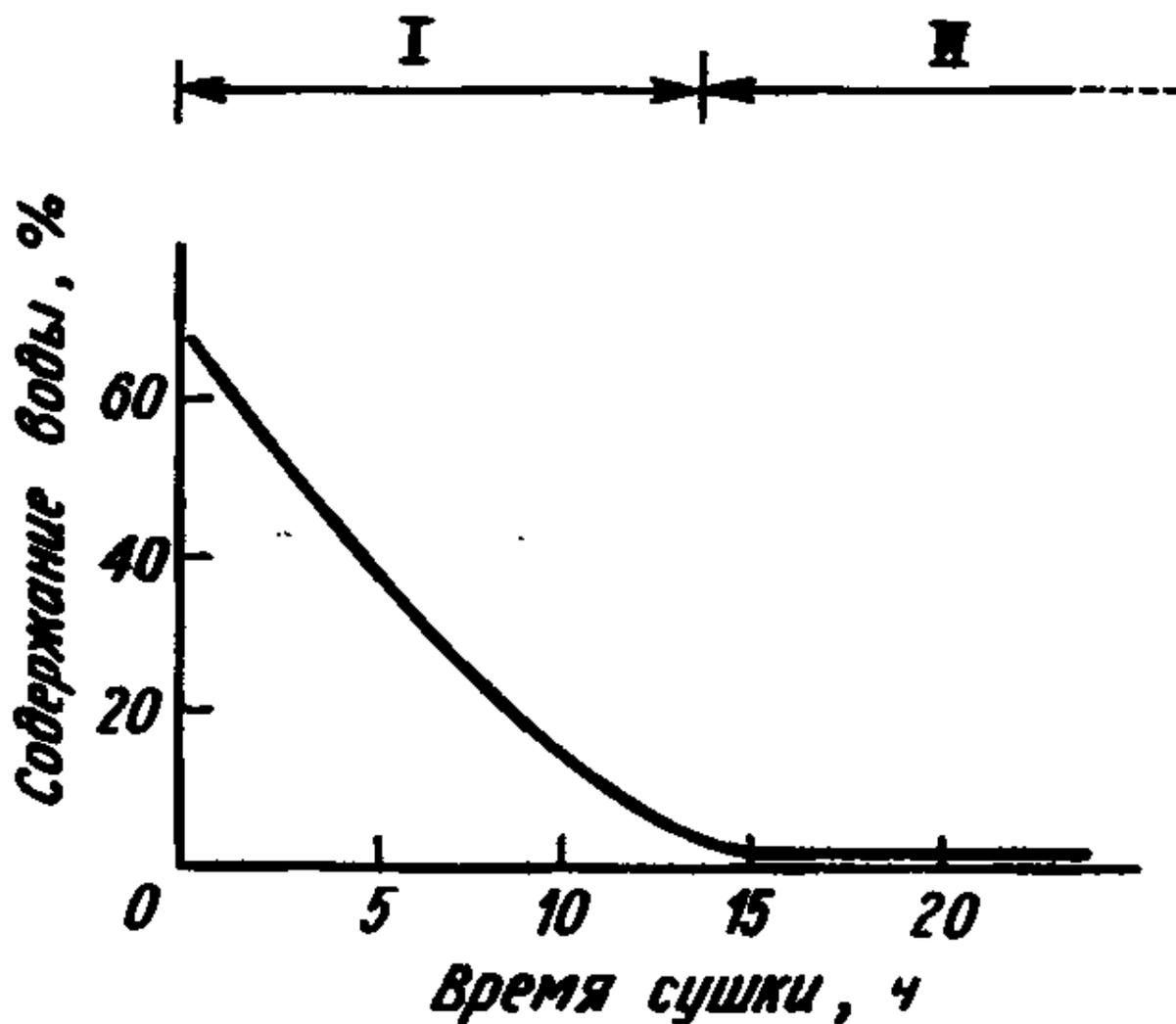


Рис. 1. Уменьшение влажности ткани в процессе сушки при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

I - основное высушивание; II- заключительное высушивание.

Данная кривая в момент перелома переходит от равномерной и мгновенной отдачи воды, к плавному и медленному заключительному этапу. В момент перехода ткань содержит около 3-4 % влаги. Длительность высушивания находится в зависимости от температуры и давления пара, направленные на замороженный материал (рис.2).

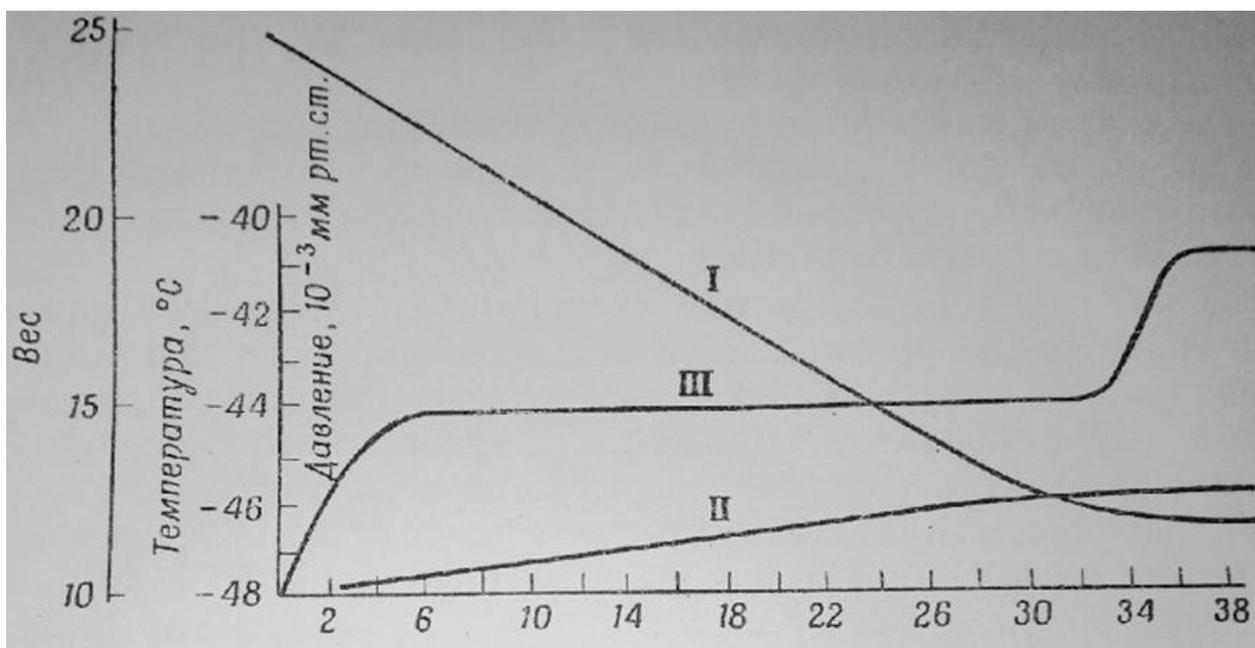


Рис. 2 . Изменение веса образца ткани в процессе лиофильной сушки.

I – вес, II – давление, III – температура.

Необходимо отметить, что постоянство веса достигается спустя 36 часов после начала сушки, причем давление изменяется незначительно. Одновременно наблюдается колебание температуры. Довольно-таки трудно предохранить пробу материала от чрезмерного охлаждения, связанного с потерей скрытой теплоты испарения. Так же следует остерегаться оттаивания ткани в ходе высушивания, так как возможно смешение структур. Экспериментально определено, что интервал от  $-45$  до  $-55^{\circ}\text{C}$ , является оптимальным для высушивания ткани, при неизменном ее стоянии [25].

Следующим этапом в лиофильной сушке является заливка тканей. Это очень важный этап и сложный момент, так как от него будет зависеть качество залитого материала. Заливочные среды могут быть разнообразны - парафин, синтетические смолы растворимые в воде (полиэтиленгликолевая

смола), целлоидин, спирт 70%, формалин и т.д. После замораживания, высушивания и заливки материала, взятого на исследования, нарезаем и наклеиваем его сухим способом на стекло. Теперь остается только лишь провести заключительную обработку, прежде чем исследовать приготовленные срезы под микроскопом. Обработка зависит в большей степени от того какой именно из отдельных компонентов среза необходимо исследовать и какие методы намерены применить. Разнообразные варианты распадаются всего на четыре категории:

- 1) исследование нефиксированного материала в инертной среде при помощи физических методов;
- 2) исследование нефиксированного материала по методу микросжигания или посредством экстрагирования буферными растворами и т.д.;
- 3) исследование соответствующим образом фиксированного материала при помощи общепринятых гистологических и гистохимических методов;
- 4) исследование посредством радиоавтографии [25].

#### 1.4. Окрашивание цито- и гистохимических материалов

После получения цито- и гистохимических мазков и срезов для их рассмотрения необходимо окрашивание. Так как в момент окрашивания происходят химические процессы, влияющие на видимость микроструктур. Качественное окрашивание дает возможность, верно, идентифицировать клеточные элементы мазка и дать оценку их особенностям при микроскопии. Целью окрашивания является более отчётливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Существуют определенные правила окрашивания:

- 1) применение любой методики окрашивания материала важно точно соблюдать последовательность процедур приготовления растворов и временные промежутки в течение процесса окрашивания;
- 2) существующие красители имеют различную интенсивность окраски. Это обязывает опытным путем установить оптимальные концентрации (разведения) и время окрашивания для каждого флакона красителя, которые устанавливаются при окрашивании серии препаратов растворами с различной концентрацией красителя, меняя длительность его воздействия. При приготовлении растворов необходимо учитывать рН воды, она должна быть нейтральной (рН 6,8 – 7,2), что обеспечивается использованием буферных растворов;
- 3) рекомендуемые методы окрашивания- аzur-эозиновый (по Романовскому, Лейшману, Май – Грюнвальду, Панпенгейму и др.), гематоксилин – эозиновый [22].

Окрашенные мазки и срезы накрывают покровным стеклом, смазанным каким-нибудь клейким веществом, которое постепенно затвердевает. Так получают препараты для достаточно долгого хранения.

Некоторые красители обеспечивают выявление различных компонентов клеток и тканей, растворяясь в выявляемых компонентах, например, в нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например, выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде [19]. В цитохимических и гистохимических методах применяют различные красители. Так как определенные красители избирательно окрашивают структуры клетки.

Таблица 1.

Основные типы красителей цито- и гистохимических срезов

Краситель	Структуры окраски	Представители
Основной или	Основания или их соли,	Гематоксилин, тионин,

ядерный	которые окрашивают структуры кислой природы (ядрышки, хроматин ядер, кариолема и т.д.)	кармин, метиловый зеленый и др.
Кислотный	Кислоты или их соли, с помощью которых выявляются вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты)	Эозин, кислый фуксин, конго красный, эритрозин
Нейтральные	Такие красители, которые избирательно окрашивают компоненты цитоплазмы (капельки жира)	Судан III, суданIV, метиленовый синий

Готовые препараты должны быть прозрачными, защищенными от высыхания и загрязнения. Данные требования обеспечивает просветление и заключение в специальные среды. Такие среды, смешивающиеся с водой, они одновременно являются и средой для заключения, и приготовления постоянных препаратов (глицерин - желатин). Другие же среды, не смешивающиеся с водой, срезы либо обезвоживают в спиртах, либо наклеивают на стекло и только потом помещают в различные из просветляющих веществ (эфирные масла, смеси с фенолом и другие) [16].

Рассмотрев детально два метода приготовления материала, можно сказать, что нужной предпосылкой с целью четкой оценки морфологических особенностей клеток в срезах и мазках считается правильно изготовленный,

качественно фиксированный, хорошо окрашенный и методологически правильно изученный материал. Неисполнение данных условий приводит к неверному распределению клеток ткани, неполноценному раскрытию их морфологических особенностей, "пропуску" важных диагностических данных на предметном стекле, тем самым, к неверной оценки цито- и гистохимических исследований, а также определение при этом особых классов органических веществ.

### 1.5. Качественные анализы методов исследования

Качественные методы цито- и гистохимических исследований, основанные на использовании реакций, с помощью которых выявляют химические вещества в клетках и тканях, а также являются одними из фундаментальных методов цитохимии и широко используется в биологии и медицине [17]. Данные методы основаны на специфичности реакции между химическим реактивом и субстратом, находящимся в клетках и тканях, и выделении продуктов химических реакций в виде окрашенных осадков.

При качественных методах анализа интенсивность реакции и локализация ее продукта определяется с помощью микроскопа. Качественные цитохимические и гистохимические реакции выявляют белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды и другие вещества, содержащиеся в исследуемом материале. Далее будут детально рассмотрены специализированные методы обнаружения каждого класса органических веществ.

#### 1.5.1. Белки

В препаратах белки распространены повсюду, несмотря на это при исследовании часто хотят показать присутствие того или иного белка в определенном месте, а также определить природу аминокислот входящих в

его состав. Иногда необходимо определить к какой из двух главных групп белков, и к какому классу в пределах этих групп принадлежит белок, содержащийся в изучаемом материале. Белки достаточно разделить на две группы. Первая - это простые белки, которые дают при гидролизе главным образом альфа-аминокислоты и их производные, и вторая - сложные белки, которые дают помимо указанных уже соединений, также незначительное количество небелковых веществ. В соответствии с данными можно разделить белки тканей на ряд отдельных классов - простые (альбумины, глобулины, альбуминоиды, глобины, гистоны) и сложные белки (неклеопротеиды, мукопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды). Данная классификация не является достаточно полной и точной. Простые белки в свою очередь можно еще подразделить на фибриллярные и глобулярные. К фибриллярным белкам можно отнести коллагены, ретикулины, кератин, миозин, эластин и фибрин, данные белки являются структурными белками, они не растворимы в водных средах. Глобулярные белки, к ним относятся альбумины, глобулины, глобины и гистоны, растворимые в водных средах. К числу классических методов идентификации белка, применяют такие как реакция Миллона на тирозин; диазониевая реакция на тирозин, триптофан и гистидин; ксантопротеиновая реакция на фенольные производные; реакция Сакагушина аргинин; нитропруссидная реакция на сульфгидридные группы. Данные реакции показывают наличие только определенных аминокислот. Тем не менее, положительная реакция считается доказательством присутствия белка, так как в исследуемых тканевых препаратах животного происхождения аминокислоты не встречаются в свободном виде [25].

Пример классической реакции на обнаружения белка посредством проведения реакция Миллона на тирозин в модификации двух разных авторов.

1. Реакция Миллона (модификация Бенсли и Герша). Приготовление реактива. К 400 мл концентрированной азотной кислоты (уд.вес 1,42)

добавить 600мл дистиллированной воды и оставить на 48 час. Развести дистиллированной водой в отношении 1:9 и насытить кристаллической азотнокислой ртутью. Профильтровать и добавить к 400 мл фильтрата 3 мл разведенной азотной кислоты указанной выше концентрации и 1,4 г азотистокислого натрия.

Метод проведения реакция Миллона на тирозин:

- 1) удалить парафин с лиофилизированных или парафиновых срезов при помощи петролейного эфира;
- 2) промыть в абсолютном ацетоне и высушить на воздухе;
- 3) залить срезы реактивом Миллона и затем либо оставить при комнатной температуре до развития максимального окрашивания, либо поместить в закрытой чашки Петри в термостат при 60°. На холоде реакция протекает медленно, тогда как в термостате она заканчивается через 30-60 минут;
- 4) промыть в холодной или теплой 2-процентной азотной кислоте (2 мл концентрированной кислоты с уд. весом 1,42 +98 мл воды);
- 5) быстро обезводить в 70-процентном и абсолютном спирте;
- 6) просветлить в кислоте<sup>4</sup>
- 7) заключить в канадский бальзам.

Результат данной реакции - белки, содержащие тирозин, окрашиваются в различные оттенки - от оранжевого до розовато-красного. Окраска сохраняется в течение 12 месяцев и дольше [25].

2. Реакция Миллона (модификация Бэкера). Автор методики рекомендует заливку в целлоидин, но это не обязательно. Приготовление реактива. Внести 10 г HgSO<sub>4</sub> в 100 мл 10-процентного раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и нагревать до растворения. Довести объем раствора до 200мл. Добавить 0,5 мл 0,25-процентного раствора NaNO<sub>2</sub>.

Метод проведения данной реакции:

- 1) провести срезы через 50-процентный спирт до воды;

- 2) поместить срезы в небольшой сосуд, содержащий реактив, и осторожно нагреть до кипения;
- 3) прекратить нагревать и дать раствору остыть до комнатной температуры;
- 4) вынуть срезы из раствора и промыть их в трех порциях дистиллированной воды (по 2 мин. в каждой порции);
- 5) заключить в глицерин - желатин;
- б) обезвоживать, просветлить и заключить в дистрен - дибутилфталат - ксилол или другую подходящую синтетическую среду.

Полученный результат, описывающие реакцию Миллона на тирозин - белки, содержащие тирозин, окрашиваются в красный, розовый или в оранжево-красный цвет [25].

3. Диазониевая реакция. Цитохимическая диазониевая реакция на обнаружение тирозина и триптофана. Одна из простых методов обнаружения белков в тканевых срезах. Производные диазония получают действием на холоде азотистой кислоты на соли первичных ароматических аминов. Обычно для этой цели применяется сульфановая кислота (п-аминобензолсульфокислота), которая после диазотирования дает диазобензолсульфокислоту. Последняя действует в щелочных растворах, соединяется с фенольной группой тирозина, с индольной группой триптофана с образование окрашенных продуктов реакции.

Диазониевая реакция, применима ко всем видам замороженных и парафиновых срезов, а также к лиофилизированному материалу. Метод проведения данной реакции:

- 1) довести депарафинированные срезы до воды;
- 2) провести нитрозирование в течении 18 часов при температуре 3°C в растворе, содержащем 6,9 г  $\text{NaNO}_2$  и 5,8 мл уксусной кислоты, объем которого доведен дистиллированной водой до 100 мл;

- 3) промыть в трех порциях дистиллированной воды охлажденной до температуры 0°C по 5 секунд в каждой порции;
- 4) поместить на 1 час при температуре 3°C в смесь, содержащую 1 г S-кислоты, 1 г КОН, 2 г мочевины и 100 мл 70% спирта. Данную процедуру следует проводить в темноте так как продукт реакции чувствителен к действию света;
- 5) промыть в трех порциях 0,1 н. HCl, по 5 минут в каждой порции;
- 6) промывать в течении 10 минут в проточной воде;
- 7) обезводить, просветлить и заключить в нейтральную синтетическую смолу.

Полученный результат, белки, содержащие тирозин, окрашиваются в цвета, варьирующие от пурпурно-красного до розового [25]. Диазиновая реакция обычно малоэффективна, так как продукты реакции гидроокисей диазониевых оснований с аминокислотами тирозином и триптофаном окрашены очень слабо. Поэтому заменяют диазиновую соль двойной диазониевой солью и присоединяют различные фенолы и амины к свободной диазогруппе белководиазониевого соединения, благодаря чему образуются интенсивно окрашенные белководиазофенольные соединения. Данные реакции используются не для обнаружения белка, а для идентификации отдельных аминокислот, в отношении которых они являются специфичными.

4. Ксантопротеиновая реакция. Реакция ксантопротеиновая применяется в неизменном виде. Положительную реакцию дают тирозин, триптофан и фенилаланин, и их присутствие в белке может быть обнаружено по яркой оранжевой окраске. Однако такая обработка сильно разрушает исследуемую ткань.

Метод проведения реакции:

- 1) 1 мл 1% раствора белка (яичного или альбумина) прибавить 5 капель концентрированной азотной кислоты, появляется осадок;

- 2) осторожно нагревают смесь, не доводя до кипения. Происходит окрашивание смеси в желтый цвет;
- 3) прекратить нагревание и дать раствору остыть до комнатной температуры;
- 4) в смесь добавляют 10 капель концентрированного раствора аммиака или 30% раствора едкого натрия.

В результате проведения реакции белки, содержащие тирозин, триптофан и фенилаланин, дают оранжевую окраску [4]. Нитропроизводные аминокислот в щелочной среде образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

5. Биуретовая реакция. С помощью этой реакции идентифицируются белки. Биуретовую реакцию дают все без исключения белки. Она обусловлена присутствием в белках пептидных связей, при разрыве связей происходит образование биурета. Это вещество в щелочной среде с солями меди ( $\text{CuSO}_4$ ) дает от сиреневого до фиолетового окрашивания. В биурете имеются две пептидные группировки -  $\text{CO}-\text{NH}-$ , которые и обуславливают появление окраски. Данная реакция отличается от выше перечисленных реакций, так как она определяет все белки независимо от того какие аминокислоты входят в их состав.

Метод проведения реакции:

- 1) 1 мл 1% раствора белка (желатина, яичного белка или сывороточного альбумина) добавить 1 мл 10% раствора щелочи ( $\text{NaOH}$  или  $\text{KOH}$ );
- 2) по каплям к полученному раствору добавляют 1% раствора сульфата меди ( $\text{CuSO}_4$ ) и тщательно встряхивают.

В результате появляется сине-фиолетовое или красно-фиолетовое, либо сиреневое окрашивание. Подтверждается наличие белков и в их молекулах пептидных связей.

Биуретовую и ксантопротеиновую реакцию можно провести с белками, полученными из растительных тканей. Получение раствора белков из растительных тканей. Очищенный клубень картофеля измельчают на терке. Полученную массу заливают 20 мл воды и растирают в кашеобразную массу, добавляют 100 мл воды и оставляют на 1 час при комнатной температуре. Затем раствор фильтруют. Фильтрат содержит водорастворимые белки. Можно извлечь белки и из пшеничной муки. Для этого в небольшую пробирку помещают 5 г пшеничной муки и заливают 20-30 мл 10%-го раствора сульфата аммония ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ). Через 30 мин раствор фильтруют, смочив предварительно фильтр раствором сульфата аммония. Если фильтрат очень мутен, то фильтруют повторно. В фильтрате содержится белок [37].

б. Определение белков по растворимости. Основой для идентификации простых белков является отсутствие у них свойств, характерных для сложных белков. Разные классы простых белков разделяют по их различной растворимости. Альбумины характеризуются растворимостью в чистой воде, глобулины нерастворимы в воде, но растворимы в различных солевых растворах, гистоны растворимы в воде, но не растворимы в разведенных растворах аммиака. Применение метода растворимости на лиофилизированном материале, позволяет осуществлять приблизительную идентификацию тканевых белков.

На срезах, наклеенных на предметные стекла без соприкосновения с водой, можно определить растворимость нефиксированных белковых компонентов. В качестве растворителя применяют, например воду, 1% раствор хлорида натрия ( $\text{NaCl}$ ), полунасыщенный и насыщенный раствор сернокислого аммония, разбавленные растворы аммиака и различные буферы [25].

Если после проведения данного метода оставшейся материал дает положительную реакцию Миллона, а также другие реакции на белки, то это

говорит о том, что исходный материал содержит не один белок, а состоит из нескольких отличающихся друг от друга по своей растворимости белков.

### 1.5.2. Нуклеиновые кислоты

В тканях животных и растений, а также в микроорганизмах встречаются два типа нуклеиновых кислот – дезоксирибонуклеиновая кислота и рибонуклеиновая кислота представляющие собой высокополимерные молекулы полинуклеидов, образованные из мононуклеотидов [25].

В цитохимических препаратах для обнаружения нуклеиновых кислот, содержащихся в органоидах клеток, разработано множество цитохимических (в том числе цветных) реакций. Многие из них высокоспецифичные, тем самым позволяют определять, какая именно нуклеиновая кислота содержится в органоиде дезоксирибонуклеиновая кислота или рибонуклеиновая кислота.

Цитохимические реакции позволяют определять точное количество нуклеиновых кислот в различных клетках или участках клетки, а также установить степень их ассоциации с белками. Классические реакции, применяемые для идентификации нуклеиновых кислот, к ним относятся 1) реакция на пурины и пиримидины; 2) реакция на дезоксирибозу и рибозу. Все эти реакции направлены на определения компонентов входящих в состав нуклеиновых кислот. В цитохимических методах исследования встречаются специфические реакции для обнаружения дезоксирибонуклеиновой кислоты, это реакция Фельгена, а также для определения рибонуклеиновой кислоты основными красителями метиловый зеленый и метиловый синий. Положительная реакция позволяют измерять отношения РНК и ДНК в клетках организма, а также доказывает их наличие.

Реакция на пурины и пиримидины. Единственная реакция, которая применялась для цитохимического выявления пуринов и пиримидинов,

является реакция тетразониевого сочетания, проводимая после бензоилирования или ацетилирования.

Проба на пуриновые основания. Метод основан на способности пуриновых оснований с аммиачным раствором нитрата серебра образовывать, осадок серебряных солей пуриновых оснований, окрашенных в светло-коричневый цвет. В пробирку вносят 0,5 мл гидролизата дрожжей, добавляют 2 мл 10% NaOH и 10 капель 1% раствора  $\text{AgNO}_3$ . Через несколько минут выпадает осадок серебряных производных пуриновых оснований [4].

Реакция на дезоксирибозу и рибозу с дифениламином. Данный метод основан на мягком кислотном гидролизе дифениламин с дезоксирибозой даёт окрашивание от лиловой до сине-черной, а с рибозой – от желтой до красной. При нагревании дезоксирибозы в кислой среде образуется фурфурол, оксилевулиновый альдегид и сходные хромогены, которые, конденсируясь с дифениламином, образуют соединения, окрашенные в синий цвет. К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 20 капель 1% раствора дифениламина и кипятят на водяной бане в течение 15 минут. Появляется сине-зелёное окрашивание [4].

Один из высокоспецифичных методов определения ДНК на мазках, тотальных препаратах и срезах представляет нуклеальная реакция Фёльгена, включает в себя два этапа. Приготовление реактива Шиффа. Растворить 1 г основного фуксина в 200 мл кипящей дистиллированной воды. Встряхивать в течение 5 минут и охладить точно до  $50^\circ$ . Профильтровать и добавить к фильтру 20 мл 1н HCl. Охладить до  $25^\circ$  и добавить 1 г метабисульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) или калия. Охладить раствор в темноте 14-24 часа. Добавить 2 г активированного угля и встряхивать в течение 1 минуты, профильтровать. Хранить фильтрат в темноте при  $0-4^\circ$ . Перед употреблением довести до комнатной температуры. Далее гидролиз в 1н HCl при  $60^\circ$ , его продолжительность меняется в зависимости от применяемого фиксатора.

Метод проведения двух фаз реакции Фельгена:

1. довести срезы до воды и удалить остатки ртути, если необходимо;
2. быстро сполоснуть в холодной 1н HCl;
3. поместить 1н HCl при 60° на оптимальный срок гидролиза;
4. быстро сполоснуть в холодной 1н HCl и затем в дистиллированной воде;
5. перенести раствор Шиффа на оптимальное время (0,5 -1 час с реактивом Томази);
6. осушить и сполоснуть в трех порциях свежеприготовленного раствора бисульфита (5мл 10-процентного  $K_2S_2O_5$ , 5 мл 1н HCl, воды до 100 мл);
7. сполоснуть в воде;
8. дополнительно окрасить если нужно (1-процентным водным раствором светло зеленого в течении 1 минуты или 0,5- процентного спиртовым раствором прочно зеленого в течении 0,5-1 минут);
9. обезводить в спирте;
10. просветлить в кислоте и заключить в бальзам или дистрен – дибутилфталат – ксилол.

Результат реакции показывает, что ДНК окрашивается в различные оттенки красновато – пурпурного цвета [25].

Один из методов окраски - это метиловым зеленым - пиронином по Браше. Основу этой реакции составляет способность метилового зеленого и пиронина давать солеобразные соединения с фосфорной кислотой, входящей в состав молекул нуклеиновых кислот. При этом из пары соседних срезов один обрабатывают рибонуклеазой для разрушения РНК. Затем оба среза окрашивают метиловым зеленым - пиронином и сравнивают. Материал, окрашивающийся в красный цвет пиронином и исчезающий на срезах, обработанных рибонуклеазой, представляет собой РНК. ДНК ядра красится метиловым зеленым в зеленый цвет. Во многих случаях, например при работе с нервной тканью, обработки рибонуклеазой не требуется, так как в

ней нет других, кроме РНК, компонентов, окрашивающихся пиронином. Наилучшим фиксатором для последующей реакции Браше является жидкость Карнуа. Фиксаторы, содержащие тяжелые металлы, негодны, так как тяжелые металлы образуют с РНК устойчивые к перевариванию рибонуклеазой комплексы.

Приготовление растворов. Метилловый зеленый необходимо очистить от образующегося в нем метилового фиолетового. Для этого порошок метилового зеленого заливают хлороформом (10-15 мл хлороформа на 0,1 г красителя), основательно взбалтывают и оставляют на 2-3 ч. Затем снова взбалтывают и фильтруют. Порошок красителя на фильтре еще несколько раз промывают хлороформом. Высушенный порошок используют для приготовления раствора красителя. Можно обрабатывать метилловый зеленый хлороформом и в растворе. В этом случае раствор взбалтывают с хлороформом в делительной воронке и отделяют отслаивающийся, окрашенный в фиолетовый цвет хлороформ. Процедуру повторяют несколько раз до тех пор, пока хлороформ не перестанет окрашиваться. Для приготовления раствора метилового зеленого пиронина 0,5 г метилового зеленого растворяют в 100 мл 0,1 М раствора ацетатного буфера с рН 4,4. К этому раствору прибавляют 0,2 г пиронина.

Методика окрашивания:

- 1) депарафинированные срезы из дистиллированной воды переносят в метилловый зеленый - пиронин на 1-2 ч и более (до 1 суток);
- 2) срезы быстро споласкивают водой, быстро обсушивают фильтровальной бумагой;
- 3) быстро (10-15 с) обезвоживают и дифференцируют в абсолютном спирте или в безводном ацетоне;
- 4) помещают в ксилол, заключают в бальзам.

Результат: ядра синевато-зеленые, РНК ядрышек и цитоплазмы розового цвета. Ферментативный контроль. Срез обрабатывают в растворе рибонуклеазы в концентрации 0,1-0,5 мг/мл в термостате при 37° С в течение 4-8 ч. Участки клетки, содержащие РНК, после такой обработки пиронином не окрашиваются. Реакция на РНК по Браше не подходит для количественного анализа. Значительно надежнее выявление нуклеиновых кислот с помощью галлоцианина и хромовых квасцов по Эйнарсону [4].

### 1.5.3. Углеводы

По идентификации углеводов в средах их можно классифицировать, на группы. Полисахариды - единственным природным представителем группы, является гликоген, который выявляется в животных тканях после обработки водным фиксатором и заливки в парафин. Существуют многочисленные разновидности гликогенов с разной степенью полимеризации. Мукополисахариды к ним относятся полисахариды, содержащиеся в качестве одного из компонентов гексозамин и встречающиеся в свободной форме или виде эфиров серной кислоты. Простые и сложные кислые полисахариды могут быть освобождены из этих соединений путем мягкого щелочного гидролиза. Мукопротеиды и гликопротеиды - это вещества, в которых полисахарид содержащий гексозамин, находится в прочной химической связи с пептидом, причем общее его содержание превышает 4%. Гликопротеиды отличаются от мукопротеидов условно, но в тоже время характерным для классификации признаком содержанием гексозамина не превышает 4%. Гликолипиды - это цереброзиды, главными представителями которых являются френозин и керазин, - основные члены этой группы. Аскорбиновая кислота (витамин С), хотя она относится к углеводным веществам, которые можно идентифицировать в тканях. Только аскорбиновая кислота выявляется по одному единственному признаку, а именно как сильный восстановитель [25].

В цито- и гистохимических исследованиях достоверные результаты получают только при обработке материалов, содержащих полисахариды. Анализ полисахаридов основан на окислении их следующими окислителями йодной кислотой, периодатом калия и натрия, хромовой кислотой. Цель окисления - получение высокомолекулярных альдегидных соединений, которые затем выявляются реактивом Шиффа, подобно тому, как это было указано для реакции Фельгена. Сама же реакция на полисахариды носит название реакции ШИК (метод Шифф-йодная кислота по Мак-Манусу). Используют различные фиксаторы и способы подготовки материала.

Метод проведения реакции ШИК:

1. довести срезы до воды и, если необходимо, удалить остатки ртути;
2. окислить 0,5 - процентным водным раствором йодной кислоты (не дольше 2-5 минут);
3. промыть в дистиллированной воде;
4. обработать реактивом Шиффа в течении 10-15 минут;
5. промыть в проточной воде в течении 5-10 минут;
6. докрасить ядра целестиновым голубым - гемалауном;
7. если необходимо, про дифференцировать в 1-процентном солянокислом спирте, а затем тщательно промыть проточной водой;
8. обезводить в спиртах просветить в кислоте и заключить в подходящую синтетическую среду.

Результатом данного метода служит, то, что белки содержащие углеводы, окрашиваются в различные оттенки пурпурно-красного цвета. Гликоген окрашивается в более темный цвет [25].

#### 1.5.4. Липиды

Вселипиды, встречающиеся в природе, можно разделить на три группы. Первая - это производные нециклических углеводов, обычно имеющих

прямую цепь; вторая - производные циклопентенофенантронов (стероиды) и третья - производные изопренов (терпены и каротиноиды). Рассмотрим только вещества, относящиеся к первой и второй группам, разделим их на ряд подгрупп. Простые липиды - соединения представляют собой сложные эфиры жирных кислот и спиртов, к которым относят жиры, масла и воски. Жиры - это нейтральные эфиры глицерина и насыщенных или ненасыщенных жирных кислот. Масла сходные по строению, но при обычной температуре они представляют собой не твердые тела, а жидкости. Воск - это сложные эфиры холестерина, который представляет собой эфиры различных жирных кислот и стероидного спирта-холестерина. Сложные липиды, содержащие жирные кислоты, спирты чаще всего глицерин и одну или несколько других групп. Их можно подразделить на фосфолипиды (лецитин, кефалины и сфингомиелины), гликолипиды (цереброзиды и ганглиозиды) и сульфолпиды. Фосфолипиды можно считать жирными эфирами фосфорной кислоты. Производные липидов различные вещества жирных кислот, которые образуются при гидролизе простых и сложных липидов. Эти жирные кислоты бывают двух типов насыщенные и ненасыщенные, в зависимости от отсутствия или наличия двойных связей в этих молекулах [25].

Выявление липидов основано либо на восстановлении некоторых химических соединений жирными кислотами, либо на использовании свойства ряда красителей лучше растворяться в жировых веществах. Для выявления отдельных видов липидов часто используют комплексы различных методов.

Качественные методы является фундаментом в цито- и гистохимических исследованиях, так как первыми использовались в данной области. Такое простое наблюдение имеет множество недостатков, необъективность при сравнении результатов разных авторов, исследование производится только на больших группах клеток.

## 1.6. Количественные анализы цитохимических методов исследования

Количественные цитохимических исследований проводят анализ содержимого вещества, которое было определено, в качественных методах. Выражаются в относительных единицах интенсивности химических реакций, представляют собой более объективную оценку результатов опыта, чем простое наблюдение. Вычисляют соответствующих изменения, происходящие в клетках и тканях, а также определяют содержания химических компонентов [16]. Так же количественные методы производят детальные подсчеты по определенным формулам.

Количественный анализ цитохимического исследуемого материала проводятся несколькими способами. Это принцип Астальди и цитофлуориметрия, которая является обязательным элементом современных цитохимических методов. При цитохимическом исследовании пользуются полуколичественной оценкой результатов, используя принцип G. Astaldi (1957), основанный на выявлении специфической окраски различной степени интенсивности. В зависимости от нее исследуемые элементы делят на четыре группы- с отрицательной реакцией (-), слабopоложительной (+), положительной (++) и резко-положительной (+++). Для количественного выражения результатов подсчитывают 100 клеток определенного вида и дифференцируют их по указанному принципу, затем число клеток с одинаковой интенсивностью окраски умножают на соответствующее данной группе число плюсов, сумма этих произведений составляет условные единицы. Активность ферментов выражают в условных единицах или в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Средний цитохимический коэффициент вычисляют по формуле Кеплоув (модификации Астальди и Верга):

$$СЦК = \frac{1a + 2б + 3в + 4г}{100},$$

где цифры (1, 2, 3, 4) обозначают интенсивность окраски; буквы (а, б, в, г) - число подсчитанных клеток с определенной интенсивностью окраски (цитохимической реакции). Метод полуколичественной оценки является ориентировочным, но позволяет сравнить распределение исследуемых веществ в различных клеточных элементах или в одних и тех же клетках при тех или иных патологических состояниях [6].

По последним данным проточная цитофлуориметрия, считается приоритетной, который позволяет разносторонне анализировать различные популяции клеток, причем не «в среднем», а каждую клетку в отдельности. Основная идея проточной цитометрии - «поштучный» анализ клеток в потоке, проходящий с большой скоростью. Суспензия клеток, предварительно помеченных светящимися молекулами (флуорохромами), помещается в поток жидкости, пропускаемый через проточную ячейку. Получается, как бы «поток в потоке», что порождает эффект гидродинамического фокусирования: исследуемые клетки выстраиваются в цепочку и в таком порядке пересекают пучок световых (обычно лазерных) лучей, служащих для анализа каждой отдельно взятой клетки. Свет, исходящий от флуорохромов, фокусируют при помощи оптической системы, состоящей из нескольких зеркал и линз, а затем раскладывают на определенные компоненты. Полученные световые сигналы преобразуют в электрические импульсы и анализируют при помощи специального программного обеспечения. Таким образом, результат цитометрического анализа - определение состояния каждой клетки в каждой из популяций образца. Всего за несколько десятков секунд сквозь проточную ячейку проходят тысячи клеток, позволяя исследователю сделать вывод о составе и характеристиках клеточной суспензии [41].

В общем виде принципы цитофлуориметрия те же, что и для фотометрии. По закону Ламбердта - Бера, поглощение света, выраженное логарифмом величины, обратной пропусканию ( $E$ ), пропорционально концентрации окрашенного вещества ( $C$ ), толщине поглощающего слоя ( $d$ ) и зависит от постоянной величины поглощения - коэффициент экстинкции данного вещества ( $K$ ), т.е.  $E=KCd$ , отсюда  $C = E/Kd$ .

Однако экспериментатору приходится считаться с рядом обстоятельств. Во-первых, в условиях цитологического эксперимента толщина поглощающего слоя определяется главным образом формой клетки. Толщину поглощающего слоя лишь в известной мере можно регулировать, добиваясь получения на микротоме среза определенной толщины. Во-вторых, вещества или окрашенные комплексы в клетках не образуют гомогенную фазу, как это имеет место в растворах при обычной фотометрии. Они чаще всего локализованы в отдельных структурах, иногда снимают только часть этой структуры, например периферии. Кроме того, эти вещества или комплексы в клетке могут быть в высшей степени агрегированные или сконцентрированы, следовательно, в этом отношении они также не могут быть приравнены к растворам. В-третьих, коэффициент молярной экстинкции вещества или его окрашенного комплекса не всегда доступен. Дело в том, что величина этого коэффициента в значительной мере зависит от физико-химического состояния самого вещества и особенно характерно взаимодействие его с другими компонентами клетки [12].

Также разработанными методами количественной цитохимии в настоящее время являются следующие:

- 1) световая микроскопия. В основе метода - анализ с помощью оптического (светового) микроскопа. Образец исследования в данном случае должен быть прозрачен или полупрозрачен, чтобы световой луч мог пройти сквозь него. Самые современные оптические микроскопы способны давать увеличение до 3 000 раз, что позволяет исследовать образцы размером от 200

нанометров. Минус метода как раз в том, что клетки меньшего размера не поддаются анализу. Такой метод подойдет для исследования различных штаммов заболеваний, опухолевых или измененных клеток. Точность оптической микроскопии приближается к 100%;

2) электронная микроскопия. Конструкция электронного микроскопа сходна с конструкцией оптического, однако функцию линз здесь выполняют электромагниты, фокусирующие и направляющие «лучи» электронов на объект исследования. Чтобы образцы были более контрастными, их зачастую «протравливают» солями тяжелых металлов. После этого клеточные структуры приобретают разную степень поглощения электронов и выделяются на экране/пленке. Таким образом, удастся «вычислить» вирусы, рассмотреть строение клеточных мембран и другие микрообъекты, например нуклеиновые кислоты. Сейчас ее используют для характеристики морфологически отличных от вируса антигенов или каких-либо ранее неизвестных вирусов. Применяется методика и в онкологии [40].

Достоинства данных методов состоят в том, что все вычисления производит аппаратура, использующая цифровую технику, тем самым расчеты становятся справедливыми, при сравнении исследований разных авторов. Так же материал исследование можно проводить на малых группах клеток. При рассмотрении основных количественных цитохимических методов исследования можно сказать, что они опираются на качественные методы. При этом их вычисления и проведения на специальной аппаратуре дают более конкретный и общий для всех количественных методов результат, и не несут субъективных характер.

Цитохимические методы дают детальное рассмотрение химических реакций, которые протекают в клетке. Более обширное изучение реакций происходит уже в тканях, при помощи специализированных методах гистохимического исследования.

Цитологический анализ в основном не предполагает вмешательства в организм пациента: почти все биологические материалы можно собрать практически безболезненно. К таким относятся: мокрота, моча, секрет предстательной железы, выделения из молочных желез, смывы и мазки с шейки и из полости матки, из цервикального канала, соскобы с ран, свищей, эрозированных поверхностей, язв. Однако есть биоматериалы, сбор которых может причинить неприятные ощущения пациенту. Более или менее инвазивными способами собирают: смывы с органов во время проведения эндоскопии, кровь, цереброспинальную жидкость, пунктаты из суставных и серозных полостей. После получения образец отправляется на процедуру анализа по одной из методик [40].

## **Глава 2. Формы организации учебного процесса деятельности учащихся в процессе изучения цитохимических реакций**

### **2.1. Лабораторные работы, как метод обучения**

Обязательной составляющей частью учебного процесса при изучении биологических и химических дисциплин является лабораторные работы, задачей которых является формирование у обучающихся практических навыков работы с оборудованием, получения и обработки экспериментальных данных, умений составлять план эксперимента, анализировать полученные результаты с литературными сведениями [14].

Лабораторная работа - это форма обучения, направленная на формирование необходимых профессиональных умений. В ходе лабораторной работы обучающиеся под наставничеством учителя или самостоятельного выполнения практической работы с целью углубления и закрепления теоретических знаний, развития навыков самостоятельного экспериментирования [3].

Имеются разнообразные подходы к установлению определения понятия лабораторная работа. В работе рассмотрены как методы обучения. Методы обучения считаются одними из важнейших частей учебного процесса. Под методом обучения понимают упорядоченный комплекс дидактических приемов и средств, посредством которых реализуются цели обучения, воспитания и развития обучающихся на каждом этапе обучения [39].

Лабораторная деятельность как метод обучения во многом носит исследовательский характер и могут быть отнесены к числу методов, активизирующих и мотивирующих учебно-познавательную деятельность учащихся. Поскольку лабораторная работа - это вид самостоятельной практической и исследовательской работы обучающихся в средней общеобразовательной и высшей школе, проводимый с целью углубления и закрепления теоретических знаний, развития навыков самостоятельного экспериментирования [3].

В настоящее время нет общего подхода к задачам, стоящим перед лабораторными занятиями. Имеются два наиболее актуальных - лабораторные работы рассматриваются как способ приобретения практических навыков работы с источниками информации, адаптированными к данному объекту исследования. В соответствии со вторым подходом лабораторные занятия предназначены для практической внедрения и подтверждения основных положений теории объекта исследования. По мнению С. И. Архангельского, главной задачей лабораторных работ является установление связи теории и практики на основе экспериментальных исследований в специально оборудованных помещениях - лабораториях [1].

К задачам, стоящим перед лабораторными занятиями, другие авторы относят расширение кругозора обучающихся, повышение интереса к и изучаемой дисциплине, выполнение творческой исследовательской деятельности [2].

Цель лабораторных работ - практическое осваивание обучающимися научно-теоретической основы изучаемого предмета, овладение учениками новой техникой экспериментирования в данной дисциплине, превращение полученных знаний в средство для решения учебно-исследовательских, экспериментальных и практических задач, формирование взаимосвязи теории с практикой [38].

Достоинства лабораторных работ в сравнении с другими видами аудиторной учебной работы состоит в том, что теоретико-методологические знания взаимодействуют с практическими умениями и навыками в процессе деятельности обучающихся учебно-исследовательского характера. Соприкосновение теории и опыта, осуществляющееся в учебной лаборатории, активизирует познавательную деятельность обучающихся и в процессе самостоятельной работы, способствует детальному и прочному усвоению теоретической информации. Лабораторная работа требует от

ученика творческой направленности, самостоятельного принятия решений, глубоких знаний и понимания учебного материала [38].

Функции лабораторной работы:

- 1) ускоряет процесс усвоения учебного материала;
- 2) развивает воображение, память, пространственное мышление, креативность, внимание;
- 3) влияет на различные черты характера: организованность, ответственность, самостоятельность и др.;
- 4) создает ситуацию для включения обучающихся в деятельность по активному исследованию и преобразованию учебной информации, что активизирует познавательную деятельность;
- 5) способствует познанию обучающимся себя в деятельности в сравнении с другими; развитию умений контролировать и анализировать свои действия, находить и исправлять ошибки, оценивать результаты своих действий и вносить в них коррективы);
- 6) позволяет педагогу выявить особенности личности обучающегося, уровень усвоения им знаний и умений.

Реализуя функции лабораторные работы по изучаемой дисциплине должны быть связаны с теоретическими уроками, служить их иллюстрацией [30].

## 2.2. Принципы организации лабораторных работ

При составлении содержания лабораторных работ следует исходить из их дидактических целей. Ведущей дидактической целью лабораторных работ является экспериментальное подтверждение и проверка определенных теоретических положений [30].

По дидактическим целям лабораторные работы могут быть иллюстративными и исследовательскими. Иллюстративные лабораторные работы подразумевают, что обучающиеся выполняют работу по определенным ими вопросам, после того как учителем были установлены теоретические положения, сделаны выводы, раскрыты закономерности и причинно-следственные связи, проведены необходимые демонстрации. Проводя иллюстративные работы, ученики детально изучают представленные вопросы, охватывают их всестороннее. Тогда как исследовательские лабораторные работы имеют другой характер, результаты учащимся не известны и только опытным путем можно перейти к тем выводам, которые прописаны в учебниках или по ходу изучения материала на уроках. В данном случае учащиеся в ходе проведения работ получают новые знания.

Лабораторные работы так же могут проводиться как иллюстративные, так и исследовательские. Однако, чтобы ставить более или менее сложный эксперимент и делать самостоятельные выводы, нужны определенные знания и опыт, чего у обучающихся к моменту проведения лабораторной работы зачастую еще нет. Поэтому в исследовательском плане обычно проводятся более простые по содержанию и выводам лабораторные работы. [30].

Выделяют следующие виды лабораторных и практических занятий: ознакомительные, экспериментальные, проблемно-поисковые [29]. По сложности и назначению лабораторные и практические занятия можно классифицировать следующим образом:

- 1) измерительные лабораторные занятия. Основная цель показать основные закономерности изучаемой дисциплины, познакомить обучающихся с техникой выполнения эксперимента и методами обработки полученных данных, с оборудованием и принципом работы;

2) практикумы, которые являются переходным этапом от накопления знаний и практических навыков, приобретаемых при усвоении общих знаний, к изучению специальных дисциплин и освоению методов научного исследования [21].

При выборе содержания и объема лабораторных работ необходимо учитывать сложность учебного материала для овладения, внутриспредметные и межпредметные связи, значимости изучаемых знаний по дисциплине, какое место занимает единичная работа в сумме лабораторных работ, и значимость для формирования целостного представления о изучаемой науке [30].

Организация и проведение лабораторных работ имеет следующую специфику:

- 1) лабораторные работы должны быть целесообразны и эффективны в данных условиях;
- 2) необходимо достаточное соотношение лабораторных работ с другими методами обучения;
- 3) при разработке лабораторных работ следует учитывать не только особенности изучаемого материала, но уровень овладения знаниями обучающихся;
- 4) в лабораторных работах должно быть продумано оценивание выполнения и результата работы;
- 5) каждую лабораторную работу необходимо диагностировать учителя, для проверки достижения педагогической цели, оформить выводы о проделанной работе [36].

При выполнении лабораторных работ учащиеся приобретают первоначальные умения и навыками, которые дальше углубляют и закрепляются. Также в ходе выполнения лабораторных работ обобщаются и

систематизируются теоретические знания, овладевают способностью использовать их на практике, развиваются интеллектуальные умения.

### 2.3. Применение электронных образовательных ресурсов при изучении элективного курса «Цитохимические реакции»

Современное образование в Российской Федерации нацелено на реализацию электронного обучения и дистанционных образовательных технологий. Возможность организации образовательного процесса с применением ЭОР закреплена в федеральном законе «Об образовании в Российской Федерации». Под электронным обучением понимается организация образовательной деятельности с применением содержащейся в базах данных и используемой при реализации образовательных программ информации и обеспечивающих ее обработку информационных технологий, технических средств, а также информационно-телекоммуникационных сетей, обеспечивающих передачу по линиям связи указанной информации, взаимодействие обучающихся и педагогических работников[35].

Электронные образовательные ресурсы составляют большую часть информационных ресурсов и представляют собой запасы информации, зафиксированные на каком-либо носителе и пригодной для ее сохранения и использования. ЭОР имеют достоинства в том, что в сравнении с другими материальными ресурсами, они неисчерпаемы, не могут израсходоваться в результате использования, самое главное постоянный рост объема [27].

Электронный образовательный ресурс может включать в себя информацию, программное обеспечение, необходимые для использования в процессе обучения. ЭОР расширяют возможности современного урока, предоставляя информацию интересно и нестандартно. Электронные образовательные ресурсы решают задачи, от которых на прямую зависит эффективность процесса обучения:

- 1) на основе вовлечения в образовательный процесс ИТК помогают развить у учащихся познавательную деятельность;
- 2) предоставляют возможность обучения по индивидуальным программам с учетом развития и заинтересованности учащихся;
- 3) увеличивают наглядное представление информации при изучении теоретического материала;
- 4) реализовывают новые образовательные технологии в процессе мониторинга в образовании;
- 5) составляют основную часть в реализации открытых и дистанционных форм обучения [7].

Самоконтроль, осуществляемый с помощью электронных образовательных ресурсов, является методом активации познавательной деятельности учащихся, получение информации о качестве освоенного изучаемого материала, правильности выполнения учебных работ, прочности сформированных умений [8].

Применение электронных образовательных ресурсов для самостоятельной работы учащихся, приводит к повышению интереса по изучаемым наукам, улучшить качество усвоенного учебного материала, как следствие, повышение качества обученности. Применение ЭОР и программных средств позволит сделать процесс обучения индивидуальным и грамотно спланировать свободное от учебных занятий время, а также улучшить качество проведения лабораторных работ за счет предварительной самостоятельной подготовки учащимися к ним. ЭОР позволят учащимся объективно оценивать свои знания и умения при подготовке к проверочным заданиям [15].

### Глава 3. Элективный курс «Цитохимические реакции»

В статье 66 Федерального закона Российской Федерации «Об образовании» № 273-ФЗ, который вступил в силу 1 сентября 2013 года, говорится, что организация образовательной деятельности может быть основана на дифференциации содержания с учетом образовательных потребностей и интересов обучающихся, обеспечивающих углубленное изучение отдельных учебных предметов (профильное обучение) [18]. Элективные курсы являются компонентом профильного обучения в старшей школе.

Элективный курс обязателен для каждого обучающегося, но стоит отметить, что выбирается он добровольно, чем и оказывает влияние на осознанный выбор будущей профессиональной деятельности. Это позволяет расширить и углубить знания учащихся по выбранным разделам образовательной программы на всех направлениях подготовки. Основными принципами обучения считаются индивидуальность, доступность и познавательность [24].

#### 3.1. Понятие элективного курса

Элективные курсы - организационные формы классно-урочной, внеклассной и внеурочной образовательной деятельности, с четко разработанной структурой и специально подобранным содержанием, отвечающим задачам предпрофильной подготовки и профильного обучения обучающихся основной и старшей школы в целях дальнейшего выбора профессии [32].

Так же можно принять следующее рабочее определение элективных курсов: элективные курсы - обязательные курсы, выбираемые школьниками в соответствии с их индивидуальными образовательными интересами и являющиеся одной из компонент, обеспечивающих профильное обучение [18].

Цель элективных курсов - ориентация учащихся на индивидуализацию обучения и социализацию, на подготовку к осознанному и ответственному выбору сферы будущей профессиональной деятельности. Перед элективными курсами стоит ряд задач:

- расширить знания по изучаемым предметам;
- обеспечить более высокий уровень знаний, умений и навыков;
- способствовать активному самоопределению, в том числе и профессиональному;
- формировать и развивать познавательный интерес к предметам.

Элективные курсы выполняют следующие функции:

- изучение ключевых проблем современности;
- ознакомление с особенностями будущей профессиональной деятельности, «профессиональная проба»;
- ориентация на совершенствование навыков познавательной, организационной деятельности;
- дополнение и углубление базового предметного образования;
- компенсация недостатков обучения по профильным предметам [9].

В документах Министерства образования и науки РФ выделяется несколько типов элективных курсов: курсы, являющиеся «надстройкой» профильных курсов и обеспечивающие для наиболее способных школьников повышенный уровень изучения того или иного предмета; курсы, обеспечивающие межпредметные связи; курсы, позволяющие школьнику, обучающемуся в профильном классе, где один из учебных предметов изучается на базовом уровне, подготовиться к сдаче ЕГЭ по этому предмету на повышенном уровне; курсы, обеспечивающие успешное продвижение в будущем на рынке труда; курсы, выходящие за рамки школьных предметов, носящие «внепредметный» или «надпредметный» характер [26].

Тематика и содержание элективных курсов должны отвечать следующим требованиям:

- иметь социальную и личностную значимость, актуальность;
- способствовать социализации и адаптации;
- поддерживать изучение базовых и профильных общеобразовательных предметов;
- обладать значительным развивающим потенциалом;
- вносить вклад в формирование целостной картины мира;
- способствовать развитию общеучебных, интеллектуальных и профессиональных умений и навыков, ключевых компетенций [5].

Состав и структура элективного курса складывается из нескольких компонентов (рис.3). При разработке каждого из них необходимо решить ряд проектировочных задач, связанных с отбором содержания и определением целевого назначения элективного курса. Для этого необходимо ответить на ряд вопросов [32].



Рис. 3. Состав и структура electiveного курса.

В данной работе представлена разработка electiveного курса для 10 класса, посвященного углубленному изучению строения клетки и обнаружения органических веществ клетки по средствам цитохимических реакций. Курс имеет название «Цитохимические реакции». Одно из разработанных уроков прошло процедуру апробации с средней общеобразовательной школе МБОУ СОШ №154 города Екатеринбург.

### 3.2. Программа electiveный курс «Цитохимические реакции»

#### 3.2.1. Пояснительная записка

Программа «Цитохимические реакции» составлена в соответствии с требованиями ФГОС СОО, реализуется в рамках социального направления развития личности плана внеурочной деятельности общеобразовательной организации. Ориентирована на учащихся в раскрытия учебно-исследовательской, лабораторной деятельности, направлена на углубленное изучение отдельных разделов биологии, таких как цитология и гистология, а также взаимосвязь химии с биологией. Electiveный курс позволяет

сформировать основы биологической грамотности, углубить и систематизировать, полученные знания.

Изучению строения клеток и их функционированию в общеобразовательных программах - ботаники, зоологии, анатомии и даже общей биологии посвящены отдельные уроки. В процессе изучения клеток учитывается формирование целостного представления о единстве организации всех живых существ на основе их клеточного строения. Науками, изучающими растительный и животный мир, его закономерности развития, базируется связь на общности методов исследования с применением цитохимических методов. В школьном курсе недостаточно времени для освещения вопросов практического применения знаний о структуре клетки. В элективном курсе практическими применениями являются цитохимические реакции, которые будут способствовать улучшению системных знаний о клетке, пониманию значимости данных методов в современном мире.

Цель курса: Формирование научного мировоззрения, понимания особенностей структурной организации клеток живых организмов. Углубление и расширение знаний об органических соединениях, которые являются фундаментом всех живых клеток, при помощи цитохимических методов.

Задачи курса:

Образовательные:

- познакомить учащихся с историей развития цитологии;
- поэтапно познакомить с клеткой как структурной единицей живого на Земле;
- расширить и углубить знания о строение и функционирование белок, нуклеиновых кисло, углеводов, жиров;
- познакомить учащихся с цитохимическими методами.

Развивающие:

- практически изучить применение цитохимических реакций на органических соединениях клетки;
- закрепить навыки работы с микроскопом;
- закрепить навыки проведения лабораторных работ.

Воспитательные:

- дать представление о значении цитологии в настоящее время;
- формирование умений и навыков комплексного осмысления знаний биологии;
- создать условия для профессиональной ориентации учащихся.

Срок реализации элективного курса: 35 часов.

Форма учебной деятельности - урок-лекция, урок-семинар по применению полученных знаний, лабораторные занятия, дистанционные задания, основанные на применение компьютерных технологий.

Типы деятельности, освоенные учащимися при изучении элективного курса «Цитохимические реакции»: практический, исследовательский, информационно-коммуникативный, познавательный.

Формы обучения - применяемые в ходе изучения курса, такие как фронтальная, групповая и при применение дистанционных форм деятельности – самостоятельная.

Применяемые методы обучения в курсе «Цитохимические реакции», следующие:

1. методы организации и осуществления учебных действий – словесные, наглядные, практические, проблемно-поисковые, самостоятельная работа с книгой, приборами, электронными носителями, а также интернет-ресурсами;

2. методы стимулирования и мотивации учащихся – учебные дискуссии, методы предъявления учебных требований;
3. методы контроля и самоконтроля – устные и письменные работы, электронное тестирование, лабораторные работы.

Элективный курс «Цитохимические реакции» рассчитан на 35 часов в 10 классе средней общеобразовательной школы. Форма занятий индивидуально-групповая с применением дистанционных технологий. Количество занятий 1 час в неделю, по 40 минут.

### 3.2.2. Планируемые результаты освоения элективного курса

Личностные:

- учащиеся будут иметь опыт общения в процессе учебной деятельности, опыт сотрудничества;
- формулировать своё отношение к биологическим объектам;
- осознавать значимость биологических наук в современном мире;
- самостоятельно формулировать общие цели, распределять роли, договариваться друг с другом, вступать в диалог;
- учащиеся будут иметь опыт работы с лабораторным оборудованием;
- личностное самоопределение по выбору будущей профессии.

-Метапредметные результаты:

Регулятивные:

- ставить учебные задачи;
- выбирать наиболее рациональную последовательность выполнения учебной задачи;

- учиться совместно с учителем и другими учениками давать эмоциональную оценку деятельности товарищей;
- оценивать свою работу в сравнении с существующими требованиями;
- владеть различными способами самоконтроля.

#### Познавательные:

- умение вести самостоятельный поиск, анализ;
- систематизировать информацию;
- структурировать информацию;
- определять проблему и способы ее решения;
- формулировать проблемные вопросы, искать пути решения проблемной ситуации;
- умение передавать информацию по средствам презентации с помощью технических средств и информационных технологий;
- поиск и отбор необходимых источников информации;
- представление информации в различных формах (письменная и устная) и видах;
- составление тезисного плана, выводов, конспекта, тезисов выступления;
- создание собственной информации, и её представление в соответствии с учебными задачами.

#### Коммуникативные:

- самостоятельно организовывать учебное взаимодействие в группе;
- выступать перед аудиторией, придерживаясь определенного стиля при выступлении;

- уметь вести дискуссию, диалог;
- находить приемлемое решение при наличии разных точек зрения.

Предметные:

Учащиеся должны знать:

- основную терминологию, этапы развития цитологии, основные положения клеточной теории, особенности строения прокариотической и эукариотической клеток химический состав клеток;
- структурное строение белков, строение нуклеиновых кислот, структурную организацию ДНК и РНК, строение углеводов, строение жиров;
- цитохимические методы исследования, подготовка препаратов, аппаратура для цитохимических методов, цитохимические реакции на определение белков, нуклеиновых кислот, а также углеводов и жиров, устройство микроскопа, роль цитохимических методов для решения современных проблем в биологии и других смешанных областях знаний.

Учащиеся должны уметь:

- уметь работать с различными источниками информации и анализировать прочитанное, составлять рефераты по интересующим их темам;
- уметь отличать по описанию и электронным картинкам цитологические препараты разных органических соединений клетки;
- изображать структурные компоненты живых клеток на основе разнообразных источников информации;
- разбираться в вопросах определения цитохимических методов исследования;
- уметь работать с микроскопом и препаратами;

- уметь работать с химическими реактивами и оборудованием.

Диагностика результатов освоения программы: тестирование, написание и защита рефератов, составление таблиц, схем, выполнение лабораторных работ.

Педагогический контроль промежуточный в ходе проведения занятия и итоговый проводится после завершения всего учебного курса в виде тестирования и защиты рефератов.

Материально-техническое обеспечение: компьютер, проектор, доска, лабораторное оборудование для проведения химических экспериментов, специализированная научная и методическая литература, презентации, схемы, микрофотографии, микропрепараты, электронные носители информации.

### 3.2.3. Содержание элективного курса

#### Введение

На вводном занятии учащиеся знакомятся с программой курса, видами заданий, предлагаемой литературой. Определяют критерии оценки деятельности учащихся.

#### Раздел 1. Основы цитологии

Современная цитология, предмет и задачи. Основное направление цитологии – цитохимия. История формирования и этапы развития цитологии. Клеточная теория – основа строения живых организмов. Основные положения теории. Особенности строения клеток эукариот и прокариот. Сходства и различия. Методы изучения клетки. Лабораторная работа устройство светового микроскопа. План строения эукариотической клетки. Органоиды клетки. Тест №1 по теме «Основы цитологии».

## Раздел 2. Органические вещества живых клеток

Белки. Классификация белков. Строение и структурная организация белковых молекул. Функции белков. Аминокислоты как основная часть белковых молекул. Нуклеиновые кислоты. Структура нуклеотида. Пуриновые и пиримидиновые азотистые основания. Отличия в составе нуклеозидов ДНК от РНК. Углеводный компонент нуклеиновых кислот. Первичная структура полинуклеотида. Вторичная и третичная структура ДНК. Структура и типы РНК. Различия в выполняемых функциях ДНК и РНК. Химические свойства нуклеиновых кислот. Углеводы. Классификация углеводов. Моносахариды. Восстанавливающие и невосстанавливающие дисахариды. Полисахариды: крахмал, гликоген, целлюлоза. Структурные компоненты липидов. Простые и сложные липиды. Тест №2 по теме «Органические вещества живых клеток».

## Раздел 3. Цитохимические методы

Основы цитохимического метода исследования. Первичная подготовка материала. Микротомы и криостаты в цитохимии. Заливка материала, лиофильная сушка. Красители в цитохимических реакциях. Лабораторная работа №1 «Изучение готовых препаратов по цитохимии под микроскопом». Особенности реакций выявления белков в клетках. Методики выявления белков. Лабораторная работа №2 «Биуретовая и ксантопротеиновая реакции по определению белков». Классические цитохимические реакции на определение нуклеиновых кислот. Метод Фельгена. Специфические цитохимические реакции на ДНК и РНК. Лабораторная работа №3 «Кислотный гидролиз дрожжей и определение состава нуклеиновых кислот». Метод проведения реакции ШИК. Обнаружение углеводов при помощи белковых молекул.

## Раздел 4. Роль цитохимии в современном мире

Применение цитохимических методов в биологии и медицине. Основные достижения цитохимических исследований, которые позволили расширить представления о структурах клеток. Защита рефератов по курсу «Цитохимические реакции».

### Тематическое планирование элективного курса

№ п/п	Содержание	Всего часов
1	Введение	1
2	Раздел 1. Основы цитологии	8
3	Раздел 2. Органические вещества живых клеток	13
4	Раздел 3. Цитохимические методы	9
5	Раздел 4. Роль цитохимии в современном мире	4
6	Итого:	35

### Календарно-тематическое планирование элективного курса

№ п/п	Тема занятий	Количество часов
1.	Введение	1
Раздел 1. Основы цитологии		
2.	Современная цитология, предмет и задачи	1
3.	История и этапы развития цитологии	1
4.	Клеточная теория	1
5.	Методы изучения клетки	1
6.	Лабораторная работа № 1 «Устройство светового	1

	микроскопа»	
7.	Особенности строения клеток эукариот и прокариот	1
8.	План строения эукариотической клетки	1
9.	Тест №1 по теме «Основы цитологии»	1
Раздел 2. Органические вещества живых клеток		
10.	Классификация белков	1
11.	Строение и функции белковых молекул	2
12.	Строение ДНК	2
13.	Структура и типы РНК	2
14.	Химические свойства нуклеиновых кислот	1
15.	Углеводы, строение, классификация, функции	3
16.	Структурные компоненты липидов. Простые и сложные липиды	1
17.	Тест №2 по теме «Органические вещества живых клеток».	1
Раздел 3. Цитохимические методы		
18.	Первичная подготовка мазков.	1
19.	Подготовки срезов с применением микротомов и криостатов	1
20.	Лабораторная работа №2 «Изучение готовых мазков и срезов цитологических микропрепаратах».	1
21.	Методики выявления белков	1
22.	Лабораторная работа №3 «Биуретовая и ксантопротеиновая реакции по определению белков»	1
23.	Классические цитохимические реакции на определение нуклеиновых кислот. Метод Фельгена	1
24.	Специфичные цитохимические реакции на ДНК и РНК	1

25.	Лабораторная работа №4 «Кислотный гидролиз дрожжей и определение состава нуклеиновых кислот»	1
26.	Обнаружение углеводов при помощи белковых молекул	1
Раздел 4. Роль цитохимии в современном мире		
27.	Применение цитохимических методов в медико-биологических науках. Значение цитохимии для медицины	1
28.	Современные достижения цитохимических исследований	1
29.	Защита рефератов по курсу «Цитохимические реакции»	2

#### 3.2.4. Методическая литература по изучению элективного курса «Цитохимические реакции»

1. Альбертс Б. и др. Молекулярная биология клетки. Ижевск: НИЦ Регулярная и хаотическая динамика, Институт компьютерных исследований, 2012. 2000 с.
2. Афанасьев Ю.И. Юрина Н.А. Винников Я.А. и др. Гистология, эмбриология, цитология М.: ГЭОТАР Медиа, 2014. 800с.
3. Борхунова Е.Н. Цитология и общая гистология. Методика изучения гистологических препаратов. Учебно-методическое пособие для студентов высших учебных заведений М.: Эдитус 2016. 144 с.
4. Быков В.Л. Цитология и общая гистология Санкт-Петербург: Сотис, 2002. 237с.
5. Карпеева Е.А., Ильина Н.А., Недошивина С.В. Цитология учебное пособие. Ульяновск: УлГПУ им. И.Н. Ульянова, 2012. 136с.
6. Криволапова Е.В. Биохимия лабораторный практикум. Бузулук: БГТИ (филиал) ОГУ2011. 114с.

7. Константинов В.М., Резанов А.Г., Фадеева Е.О. Биология для профессий и специальностей технического и естественно-научного профилей. М.: Издательский центр «Академия» 2017. 336с.
8. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н., Горячкина В.Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии 2-е издание. М.: Медицинское информационное издательство 2002. 374с.
9. Машкина О.С., Белоусов М.В., Попов В.Н. Цитология: учебно-методическое пособие для вузов. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2013. 97 с.
10. Стволинская Н.С. Цитология. М.: Прометей 2012. 238с.
11. Фролов Ю.П., Серых М.М., Макурина О.Н. и др. Биохимия и молекулярная биология. Самара: Издательство «Самарский университет» 2004. 501с.

### 3.3. Урок «История формирования и этапы развития цитологии»

Цели урока: сформировать представления о цитохимии, расширить знания об истории становления науки цитология.

Задачи:

Обучающая: обобщить и систематизировать знания о науке цитология. Углубить знания в истории развития цитологии и ученых внесших вклад в развитии общей дисциплины биологии. Обеспечить в ходе урока усвоение основ цитохимии.

Развивающая: формировать умения выделять главное от второстепенного, сравнивать, делать выводы. Способствовать развитию умения логически рассуждать, кратко, четко, исчерпывающее излагать свои мысли. Формировать образное мышление, умение отстаивать свою точку зрения. Умение анализировать ответы учащихся и оценивать их. Формировать навыки учебной деятельности работы с электронными ресурсами.

Воспитательная: формирование во время урока причинно-следственных связей между цитохимией и современной медициной. Воспитывать уважение к противоположному мнению, аккуратность и дисциплину труда. Формирование интереса к предмету биология. Способствовать развитию у учащихся требовательности к себе, чувству коллективизма. Усовершенствование навыков работы в группах.

Тип урока: урок усвоение новых знаний.

Вид урока: урок - беседа с использованием электронных образовательных информационных технологий.

Используемые педагогические технологии: диалогового взаимодействия, частично-поисковая, групповые, информационные технологии обучения.

Методы: словесные (беседа, диалог), наглядные (видеоролики, электронные материалы), практические (метод контроля).

Форма организации учебного процесса: индивидуальна работа, работа в группах.

Планируемые результаты обучения:

Предметные: знать историю становления науки цитологии, уметь проводить параллели с историей становления научной дисциплины биологии. Знать понятие цитохимия, классификацию цитохимических методов, их принцип действия и область применения.

Метапредметные: научиться приемам самоорганизации, организовывать совместную деятельность с учащимися и учителем. Уметь логически выстраивать причина - следственные связи, формулировать логические рассуждения по теме, анализировать информацию. Формировать умения владения электронными технологиями во время урока.

Личностные: формировать собственное мировоззрение на современное развитие дисциплины. Признание высокой сложности и ценности жизни. Уметь оценивать и осознавать свой вклад в общий результат групповой работы и урока в целом.

Учебно-методическое обеспечение: компьютер, проектор, экран, компьютерная презентация, раздаточный материал, электронные носители.

#### Пояснительная записка

Теоретический урок «История формирования и этапы развития цитологии.» следует вторым в разделе «Основы цитологии», способствует формированию и осмыслению знаний о развитии цитологии как науке, значимость цитохимии в цитологии.

Для организации применения электронных образовательных ресурсов во время урока по теме «История формирования и этапы развития цитологии» выбраны: платформа для обмена электронными ссылками «Сферум» (Электронная российская площадка для общения и видеоконференций учителей с учениками), а также система дистанционного тестирования «Google Forms».

Применение современных информационно-коммуникативных технологий на уроках совместно со словесными и наглядными методами, а также использование электронной образовательной информацией и онлайн контроля делает урок более интересным, с высокой самостоятельностью и вовлеченностью учащихся в процесс. Занятие направлено на формирование универсально-учебных действий, развитие познавательных, развивающихся и воспитательных качеств личности, духовно-нравственного развития учащихся [13].

## Ход урока

### 1. Организационный момент.

Учитель: приветствие с учащимися. Проверяет готовность к уроку и настраивает на начало работы. Фиксирует отсутствующих.

Ученики: приветствуют учителя.

### 2. Актуализация опорных знаний.

Учитель: демонстрация презентации, слайд с формулировками терминов.  
Проводит фронтальный опрос.

### Терминологическая разминка (фронтальный опрос)

1) структурно-функциональная элементарная единица строения и жизнедеятельности всех организмов – это .....

2) .....(от греч. kytos - клетка, logos - учение) - наука о клетке. Она включает рассмотрение вопросов о развитии, строении и функциях клеток и их производных, а также механизмов воспроизведения и взаимодействия.

3) цитология составляет необходимую часть ....., так как клетки являются основой развития, строения и функций тканей.

4) цитология подразделяют на два отдела: ....., .....

5) изучением особенностей специализированных клеток различных тканях и органах занимается .....

б) в разделе ..... цитологии рассматриваются общие принципы строения и физиологии клеточных структур.

Ученики: отвечают на вопросы. Осуществляют взаимоконтроль, при необходимости корректируют. Ответы: 1) клетка, 2) цитология, 3) гистология, 4) общая, частная; 5) частная цитология; 6) общей.

Учитель: делит учащихся на 3 группы (по рядам). Выдаёт задание для каждой группе (прил.1). Устно подготовить ответы на вопросы, заслушивают ответы, совместно обсуждают результаты.

Решение задач современной цитологии, предположения будущего для цитологии.

1 группа – ответить на вопрос какие задачи решает современная цитология?

2 группа – ответить на вопрос место применения цитология?

3 группа – ответить на вопрос какие задачи будет решать цитология в будущем?

Ученики: получив задание, каждый учащийся сначала работает индивидуально с информационным материалом, далее готовят группой ответ, а после выполнения задания представитель каждой группы озвучивает результат, остальные слушают ответы, при необходимости комментируют.

После выполнения задания учащиеся возвращаются на свои места.

3. Постановка цели занятия. Мотивация учебной деятельности учащихся.

Учитель: демонстрирует слайд презентации. Зачитывает эпиграф и предлагает учащимся предположить тему занятия.

*«Наука не является и никогда не будет являться законченной книгой».*  
(Альберт Эйнштейн).

Ученики: высказывают предположения

Учитель: выслушивает предположения учащихся и направляет к самостоятельному формулированию темы: «История формирования и этапы развития цитологии». Тема урока появляется на экране.

Ученики: формулируют тему урока. Записывают её в тетрадь.

Учитель: ведет подводящий диалог с учащимися, ставит проблемные вопросы. Выслушивает ответы.

Может ли целостная биологическая дисциплина появиться в короткий промежуток времени? Как вы думаете один ученый может сформировать науку? Как могут повлиять применение химических веществ в биологических методах исследования клеток? Как вы можете сформулировать цель занятия?

Ученики: отвечают на вопросы, высказывают предположения. Осознают мотивацию, включаются в рабочую деятельность.

#### 4. Применение знаний и умений.

Учитель: дает учащимся задания (демонстрация экрана). Включает просмотр видеоролика (Л.5\_1/из истории цитологии/ общая биология <https://www.youtube.com/watch?v=8fBflok1Vvs>). Помогает выделять самое главное.

Задание №1

Просмотрите видеоролик. По ходу просмотра заполните таблицу: «История цитологии». Оформите в рабочей тетради.

Год	Ученый	Вклад в развитие цитологии

Учитель: делит учащихся на 4 группы и выдаёт задание, пользуясь электронным носителем. Ссылка на информационным материал скидывается в общий чат с учащимися через платформу «Сферум». Для детей, у которых нет телефона, выдается раздаточный материал с информацией из электронного носителя.

Задание № 2. Пользуясь электронными носителями, изучите материал «Цитохимические методы исследования» и подготовьте выступление по группам.

1 группа - краткая характеристика цитохимических методов исследования.

2 группа – классификация цитохимических методов исследования.

3 группа - принцип действия цитохимических методов.

4 группа - область применения цитохимических методов исследования.

Ученики: выполняют задание, совместно обсуждают. Корректируют друг друга и оценивают ответ учащихся.

Учитель: дает учащимся задания (демонстрация экрана).

Задание № 3. Ответьте на вопрос: *значение цитохимических методов исследования для цитологии и медицины в целом?*

Ученики: письменно отвечают на вопрос. Один из учащихся зачитывает свой ответ.

## 5. Контроль знаний.

Учитель: размещает ссылку на тестовое задание в Гугл-формах в общем чате (<https://forms.gle/gSwXj1X3jRu96QSm7>) (прил. 2).

Ученики: переходят по ссылке и выполняют тестовое задание

## 6. Подведение итогов.

Учитель: проводит анализ результатов занятий, определяет уровень запоминания материала, заинтересованность учащихся, достигнутые результаты, ошибки, подводит итог занятия.

Ученики: слушают преподавателя, оценивают качество своей и групповой учебной деятельности.

## 7. Рефлексия

Учитель: выдает лист самооценки.

Лист самооценки (ФИ, класс) \_\_\_\_\_

№ п\п	Критерии оценивания	Оценка		
		Всё получилось	Не совсем всё получилось	Не получилось (почему)
1	Найти информацию самостоятельно			
2	Выбрать самое основное для сообщения			
3	Оформить работу			

4	Применять электронные носители на уроке			
5	Оцени свой вклад в работу группы.			
6	Оцени самостоятельную работу на уроке			
7	На уроке мне понравилось			

Ученики: проводят самооценку.

Учитель: благодарит всех учеников за участие в занятии. Собирает листы самооценивания. Прощается с ребятами.

Разработанный урок по теме «История формирования и этапы развития цитологии» в элективном курсе «Цитохимические реакции», был апробирован в ходе педагогической практики.

Апробация проводилась в 10 классе МБОУ СОШ №154 во втором полугодии 2021-2022 учебного года. Апробация проводилась в рамках элективного курса, на который отводится 1 час в неделю.

Цели апробированного урока:

- установить степень результативности применения электронных технологий на усвоения и овладение новых знаний;
- выявить влияние ИКТ на мотивацию учеников;
- узнать применимость использования электронных технологий при работе учащихся в группах;
- оценить необходимость корректировки планов на следующие внеурочные уроки по элективному курсу.

Урок был построен так, что учащимся необходимо было просмотреть видеоролик, и законспектировать основную информацию из него. Далее предполагалась работа в группах с использованием электронных источников информации. Учащимся была направлена ссылка в общий чат с учителем через платформу «Сферум», к данной платформе подключены все учащиеся и учителя школы. У большинства учеников из класса не возникло затруднений, зайти в чат и перейти по ссылке, чтобы ознакомиться с информацией и ответить на вопрос, но были учащиеся, у которых возникли затруднения с открытием ссылки и нахождением нужной информации в электронном носителе. Учащиеся индивидуально ознакомились с информацией и группой подготовили открытый ответ. Все группы справились с поставленным заданием и подготовились к обсуждению вопросов.

Подведение итогов урока было электронное тестирование прямо на уроке, каждый учащийся перешел по ссылке на онлайн-тестирование. Ученику необходимо было указать свою фамилию и пройти тест. После прохождения теста учитель мог отследить количество прошедших учеников тест. По результатам теста был сформирован график «Результаты тестирования», усвоения материала.



Рис. 4. Результаты тестирования по пройденной теме урока (по горизонтали список учеников, по вертикали количество баллов за задания).

Исходя из данных графика можно сформулировать следующее: 74% учащихся освоили новую тему, по средствам использования электронных и информационных носителей, 17% освоили материал в не полной мере, возможные уменьшения показателей из-за наличия ошибки по невнимательности или быстроты выполнения заданий. 9% учащихся неудовлетворительно освоили данную тему, возможная причина незаинтересованность в изучении новой темы, слишком низкая мотивация.

Урок с применением электронных информационных средств обучения вызывает у учеников интерес и повышает активность работы на уроке, что в результате приводит к лучшему усвоению материала.

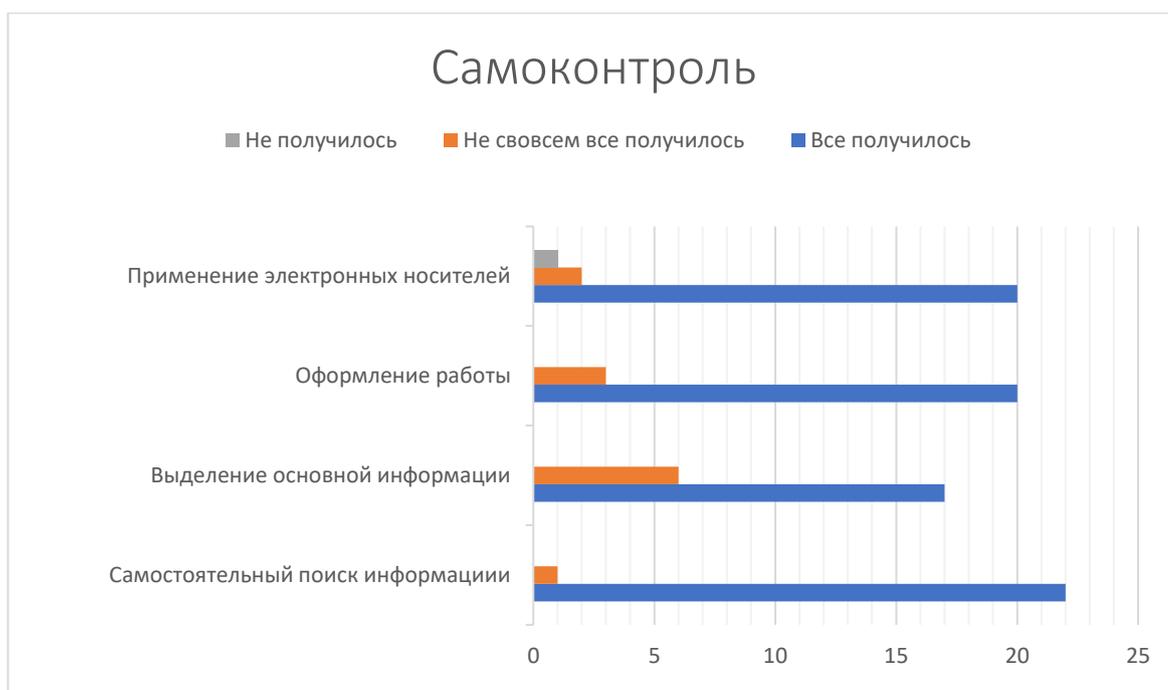


Рис. 5. Результаты самоконтроля учащихся (по горизонтали список учеников, по вертикали деятельность учеников во время урока).

После обработки листов самоконтроль было выявлено, что у большинства учащихся не составило трудностей использования электронных носителей и поиск информации. Незначительные трудности возникли с выделение основной информации. В данном случае необходимо при дальнейшем изучение элективного курса на уроках большее внимание уделять совместному прочитыванию текста и выделению ключевых слов, проводить анализ текста в диалоговой форме общения между учениками и учителем.

По результатам апробации урока можно сформулировать следующие выводы:

Техническое оснащение школы (компьютер с выходом в интернет, экран, колонки) и открытый доступ учащихся в электронные образовательные ресурсы, позволяет в полной мере использовать их в процессе освоения новых знаний на уроке. Учащиеся имеют опыт использования электронных ресурсов для осваивания учебного материала. Урок с применением

электронных образовательных ресурсов и работой в группе повышает интерес у учащихся к изучению нового материала и его освоения.

### 3.4. Методические указания к лабораторной работе по цитохимическим реакциям

Современные стандарты ФГОС выделяют ведущую в процессе обучения учебно - познавательную деятельность учащихся, на первый план выдвигают компетентность ученика в сфере самостоятельной деятельности. Лабораторный работы - как один из видов самостоятельных работ активизируют учебный процесс, облегчают восприятие геометрических понятий, обеспечивают доступность геометрических фактов, которые в дальнейшем постоянно применяются при решении задач. Лабораторные работы имеют огромное значение в учебно-воспитательном процессе, так как в наибольшей степени позволяют реализовать важные принципы дидактики - деятельностный подход и гуманизацию процесса обучения. Ученик из объекта научения превращается в субъект собственной деятельности [Фирстова].

В элективном курсе «Цитохимические реакции» были разработаны две лабораторные работы, которые соединяют междпредметные связи дисциплин биологии и химии.

#### 3.4.1. Лабораторная работа №3 «Биуретовая и ксантопротеиновая реакции по определению белков»

**Цель:** освоить методы идентификации отдельных аминокислот и белков.

**Исследуемый материал:** заранее приготовленный водный раствор яичного белка.

Реактивы: 10 %-й раствор гидроксида натрия, 1 %-й раствор сульфата меди, концентрированная азотная кислота, концентрированный раствор аммиака.

Оборудование: штатив, пробирки, спиртовки, держатели пробирок, спички.

Основополагающая информация по теме занятия: белки представляют собой высокомолекулярные полимерные органические соединения, построенные из аминокислот. В природе известно более 500 различных аминокислот, однако белки формируются всего лишь из 20, при этом аминокислоты белков представляют собой  $\alpha$ -аминокислоты. Это кислоты, аминированные в  $\alpha$ -положении; амино - и карбоксильная группа присоединены к одному и тому же атому углерода, который называют  $\alpha$ -углеродом. Аминокислоты в молекуле белка соединены между собой пептидными связями.

Аминокислоты различаются друг от друга природой радикала. Это разнообразие дает возможность обнаружения большинства аминокислот с помощью цветных реакций. Многие из них весьма чувствительны и высокоспецифичны, что позволяет открывать ничтожные количества той или иной индивидуальной аминокислоты в составе сложных смесей, биологических жидкостях и т. п. некоторые цветные реакции находят применение для количественного определения аминокислот [28].

Физико-химические и биологические свойства белков определяются их аминокислотным составом. Аминокислоты - это аминопроизводные класса карбоновых кислот, входящих в состав белков и выполняющие специальные функции [31].

Методы качественного обнаружения белков основаны на двух типах реакций: а) по пептидным связям белковой молекулы. б) по её аминокислотным радикалам. Примером реакции первого типа служит биуретовая реакция. Примерами реакций второго типа являются многочисленные цветные реакции на радикалы аминокислот, например ксантопротеиновая реакция. По характеру цветных реакций второго типа можно судить до некоторой степени о составе белков.

Техника безопасности: перед тем как приступить к выполнению лабораторной работы, вспомним вместе технику безопасности. Пользуясь материалами: Техника безопасности при проведении лабораторных работы по химии (прил. 3).

### Ход работы

Опыт №1. Биуретовая реакция.

1. в пробирку налейте 1 мл раствора белка и добавьте такой же объём 10% раствора гидроксида натрия (NaOH).
2. к полученной смеси прилейте 2-3 капли раствора сульфата меди (II). Пробирку встряхните.

Опыт №2. Ксантопротеиновая реакция.

1. налейте в пробирку 2 мл раствора белка и добавьте по каплям концентрированный раствор азотной кислоты (HNO<sub>3</sub>).
2. осторожно нагрейте смесь в пробирке. Выпадает осадок желтого цвета.
3. после охлаждения в пробирку прилейте по каплям избыток концентрированного раствора аммиака. Желтая окраска переходит в оранжевую.

Вывод: в первом опыте наблюдаем при действии на белок сульфат меди (II) в щелочной среде возникает фиолетовое окрашивание. Происходит за счет образования комплекса меди с пептидной связью в молекуле белка, что говорит о его присутствии. Во втором опыте при действии на белок концентрированной азотной кислотой образуется белый осадок, который при нагревании желтеет, а при добавлении водного раствора аммиака становится оранжевым. Свидетельствует о качественных различиях состава различных белков, а именно об наличие тирозина или триптофана или фенилаланина в молекуле белка.

### 3.4.2. Лабораторная работа №4 «Кислотный гидролиз дрожжей и определение состава нуклеиновых кислот»

Цель: освоить методы определения наличия нуклеиновых кислот в клетках дрожжей.

Исследуемый материал: дрожжи.

Реактивы: 10%-ный раствор  $H_2SO_4$ , концентрированный  $NH_3$ , 1%-ный раствор  $AgNO_3$ , молибденовый реактив, концентрированная  $H_2SO_4$ , тимол.

Оборудование: круглодонная колба (объемом на 100 мл) с воздушным холодильником, воронка с фильтром, мерный цилиндр, пробирки.

Основополагающая информация по теме занятия: нуклеотиды - это мономерные единицы нуклеиновых кислот, которые содержат три химических различных компонента: гетероциклическое азотистое основание, моносахарид (пентозу) и остаток фосфорной кислоты. При изучение строения ядра клетки путем цитохимических реакций, была обнаружена единственная реакция на пурины и пиримидины, являющиеся составными частями нуклеиновых кислот [10]. Нуклеиновые кислоты: хорошо растворимы в воде, практически не растворимы в органических растворителях, очень чувствительны к действию температуры и критических значений уровня рН, молекулы ДНК с высокой молекулярной массой, выделенные из природных источников, способны фрагментироваться под действием механических сил, например при перемешивании раствора [22].

Классические реакции, применяемые для идентификации нуклеиновых кислот, к ним относятся 1) Реакция на пурины и пиримидины; 2) реакция на дезоксирибозу и рибозу. Все эти реакции направлены на определения компонентов входящих в состав нуклеиновых кислот. В цитохимических методах исследования встречаются специфические реакции для обнаружения

нуклеиновых кислот. Положительная реакция позволяет измерять отношения РНК и ДНК в клетках организма, а так же доказывает их наличие [4].

Техника безопасности: перед тем как приступить к выполнению лабораторной работы, вспомним вместе технику безопасности. Пользуясь материалами: Техника безопасности при проведении лабораторных работ по химии (прил. 3).

### Ход работы

Образование фильтрата путем кислотного гидролиза нуклеиновых кислот.

1. поместите 1 г пекарских дрожжей в круглодонную колбу на 100 мл;
2. добавьте 20 мл 10%-го раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды;
3. колбу закрыть пробкой с длинной стеклянной трубкой и кипятят под тягой в течение часа на асбестовой сетке при слабом нагревании;
4. через час после начала кипения нагревание жидкости прекращают, дают ей остыть, переносят в цилиндр, доводят водой до первоначального объема и фильтруют. С фильтратом проделывают качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот.

Опыт №1. Качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот. Серебряная проба на пуриновые основания.

Полученный фильтрат из первого опыта нейтрализуют 10 капель гидролизата 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1%-го раствора азотнокислого серебра. Через 3-5 мин выпадает небольшой бурый осадок серебряных производных пуриновых оснований.

Опыт №2. Качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот. Качественная реакция Молиша на пентозную группировку.

1.к 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2-3 капли 1%-го раствора тимола (2-изопропил-5-метилфенол), перемешивают;

2. по стенке пробирки осторожно наслаивают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом.

Опыт№3. Качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот. Молибденовая проба на фосфорную кислоту.

К 3-5 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорно-молибденовокислого аммония.

Вывод: при кислотном гидролизе клетки дрожжей вначале распадаются на белок и нуклеиновые кислоты, а затем при продолжительном гидролизе наступает их полный распад на полипептиды, пуриновые и пиримидиновые основания, рибозу, дезоксирибозу и фосфорную кислоту. В первом опыте наблюдаем выпадение небольшого бурого осадка серебряных производных пуриновых оснований. При проведение второго опыта взаимодействия концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз - оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или а-нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета. При проведение третьего опыта на качественные реакции нуклеиновых кислот жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При её охлаждении образуется желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорно-молибденовокислого аммония.

## Заключение

В данной работе представлена теоретическая часть цитохимических методов исследования, разобранная по литературным источникам. Данные методы являются структурно единым целым, но при этом сохраняют свою самостоятельность. При их детальном рассмотрении самым первым и важным следует отметить условия приготовления мазков и срезов в цитохимических методах. Во время изготовления мазков значимым является получение полноценного материала, так как в дальнейшем при рассмотрении их химических реакции потребуется большая площадь исследуемых клеток. Существуют так же определенные правила приготовления и фиксации мазка, которые необходимо знать при работе с исследуемым материалом. В гистохимических методах исследования выделяют такие приборы, по изготовлению срезов, как микротомы и криостаты. При выполнении срезов в данных приборах необходимо соблюдать определенные условия, снятия и перенос их, во избежание повреждения исследуемого материала. В дальнейшем полученный материал, необходимо, химически обезводить и залить, а второй - это лиофильная сушка, более усовершенствованный метод, имеющий две стадии, крайний этап перед окрашиванием. Окрашивание цитохимических методов производится по определенным правилам, при использовании специальных красителей. Именно от правильной последовательности и аккуратности выполнения будет зависеть дальнейший анализ цито- и гистохимических методов исследования.

Данный анализ подразделяется на качественный и количественный. Количественная оценка исследуемого материала несет субъективный анализ, так как он производится при помощи специальных формул и оборудования, что делает их более достоверными. Второй анализ имеет недостаток необъективности, так как его проводят в большей степени визуально при помощи микроскопа. В качественном методе определяют все органические структуры клеток и тканей, при помощи определенных принципов и

закономерностей. Обнаружение биологических полимеров в цитохимических методах проводятся по единым закономерностям, определяющим группу исследуемых веществ (белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, жиры). Смысл, которых заключается в дальнейшем использование для лабораторных работ, медицинских целях и т.д. У каждой группы имеется свой специфический метод по обнаружению их в исследуемых клетках и тканях. Эти методы являются качественными методами цитохимических исследований. Данные методы имеют самостоятельные правила по изготовлению исследуемого материала (мазков и срезов), но единые методы по обнаружению биологических полимеров в этих специально заготовленных мазках и срезах. Цитохимические реакции имеют широкий спектр применения и чрезвычайно важны как для науки биологии, так и для химии, а также современной медицины.

При рассмотрении цитохимических основ формами организации учебного процесса, применяемые в школьном курсе были выбраны лабораторные занятия. Лабораторные работы позволяют самостоятельно ученикам в ходе работы воспринимать понятия и в дальнейшем применять в ходе решения различных задач. Лабораторные работы активизируют учебный процесс учащихся, имеют значение в учебно-воспитательном процессе, позволяя реализовывать деятельностный подход. Учащийся из объекта научения превращается в субъект собственной деятельности. Именно субъективная позиция ученика является характерной чертой развивающего обучения. Так же при организации учебного процесса во время изучения цитохимических реакций применимы электронные образовательные ресурсы, как один из приемов в развитии компетенций учащихся в области использования информационно-коммуникативных технологий. ЭОР позволяют улучшить самостоятельную деятельность учащихся, приводят к повышению интереса по изучаемым наукам, повысить качество усвоенного учебного материала, как следствие, повышение качества обученности. Применение ЭОР и программных средств позволит сделать

процесс обучения индивидуальным, а также улучшить качество проведения лабораторных работ за счет предварительной самостоятельной подготовки учащимися к ним.

На основе данного теоретического материалы был создан элективный курс, включающий в себя межпредметные связи дисциплин биологии и химии. Курс «Цитохимические реакции» является элективным, так как соответствует целям и задачам элективных курсов, имеет рекомендательный характер и неограниченное количество часов на изучение.

Цель изучения элективного курса – ориентация на индивидуализацию обучения и социализацию учащихся, на подготовку к осознанному и ответственному выбору сферы будущей профессиональной деятельности. Данный элективный курс исходя из цели отвечает следующим требованиям:

- иметь социальную и личностную значимость;
- способствует социализации и адаптации учащихся;
- поддерживает изучение базовых и профильных общеобразовательных предметов, таких как биология и химия;
- обладает значительным развивающим потенциалом, способствовать формированию целостной картины мира [33].

Элективный курс позволяет расширить и систематизировать знания учащихся о структуре и функциях клетки, клеточных структурах, познакомить с современными достижениями и перспективными направлениями развития цитологии. Изучить особенности биохимического состава клетки, при помощи цитохимических реакций. Усовершенствовать навыки самостоятельной работы при проведение лабораторных работ, так же навыки работы с электронными образовательными ресурсами, благоприятно влияющие на безопасное использование Интернет-ресурсов.

Согласно разработанной программе элективного курса «Цитохимические реакции» рассчитан на 35 часов занятий, один час в

качестве резервного, предназначен для учащихся 10 классов. Изучение данного курса помогает учащимся в дальнейшем профессиональном самоопределении. Программой предусмотрено изучение теоретических аспектов, проведение уроков с использованием электронных образовательных ресурсов и лабораторных работ.

В ходе разработки элективного курса был написан и апробирован урок, с применением электронных образовательных ресурсов, в рамках педагогической практики на учащихся 10 «А» класса МБОУ СОШ №154 г. Екатеринбург. Благодаря использованию ЭОР были зафиксированы результаты усвоения нового материала и представлены в виде графиков, преобладающее количество учеников 74% в полной мере овладели новым материалом. Так же были разработаны лабораторные работы по определению содержания органических веществ в клетке при помощи цитохимических реакций, а именно обнаружение белков в животной клетке и определения нуклеиновых кислот, благодаря кислотному гидролизу дрожжей.

Таким образом, изучение цитохимических реакций по средствам применения лабораторных работ и электронных образовательных ресурсов позволит сформировать учебные компетенции школьников, такие как учебно-познавательные, коммуникативные, информационные, личностные компетенции. Данные занятия позволяют взаимодействовать с объектами исследования и погрузиться в самостоятельную деятельность по изучению строения клеток всех живых существ.

## Список источников

1. Архангельский С. И. Учебный процесс в высшей школе, его закономерные основы и методы / С. И. Архангельский. М.: Высшая школа, 1980. 368 с.
2. Беховых Л. А., Беховых Ю. В, Сизов Е. Г. Оптика: лабораторный практикум. Барнаул: Изд-во АГАУ, 2012. 96 с.
3. БимБад Б. М. Педагогический энциклопедический словарь. М.: Большая российская энциклопедия, 2002. 528 с.
4. Бродский В.Я., Введение в количественную цитохимию. М: МИР, 1969. 439 с.
5. Болотина Т.В. Вяземский Е.Е. Профильное обучение в контексте ФГОС и нового Закона РФ «Об образовании и Российской Федерации» Профильная школа, 2013. 7с.
6. Вяткина П. Полный медицинский справочник фельдшера. М.: Эксмо, 2012. 830 с.
7. Грибанова-Подкина М. Ю., Сухорукова Е. В. Использование информационно-коммуникационных технологии электронных ресурсов в образовательном пространстве. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2020. 64 с.
8. Дырдина, Е.В., Запорожко В.В., Кирьякова А.В. Информационно-коммуникационные технологии в компетентностно-ориентированном образовании. Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2012. 227с.
9. Елисеева И.Н. Элективный курс «уровневая организация живой природы» как средство повышения эффективности обучения биологии в профильной школе: диссертация кандидата педагогических наук: 13.00.02 /Елисеева Ирина Николаевна; [Место защиты:Астрахан.гос. ун-т]. – Астрахань, 2010. – 196 с.
- 10.Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М: Мир, 1987.

11. Кацнельсон Е. И. Гистохимические методы исследования тканей лабораторных животных. В: Витебский государственный университет им. П.М. Машерова, 2016. 394 с.
12. Конарев В.Г., Тютюрев С.Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений. Л: Колос, 1970. 193с.
13. Константинов В.М., Резанов А.Г., Фадеева Е.О. Биология для профессий и специальностей технического и естественно-научного профилей. М.: Издательский центр «Академия» 2017. 336с.
14. Князева Е.М. Лабораторные работы нового поколения. Журнал Фундаментальные исследования № 6 2012. 587-590 с.
15. Куценко С.М., Косулин В.В. Электронные образовательные ресурсы как инструмент обучения. Вестник КГЭУ 2017. 1-7с.
16. Луппа Х. Основы гистохимии. М: МИР, 1980. 343 с.
17. Милюков В. Е., Мхитаров В. А., Нгуен К. К., Муршудова Х. М., Жарикова Т. С. Современные морфометрические методики оценки гистохимических методов исследования. В: Научная книга, 2013. 63 с.
18. Новак Н.М. Элективные курсы как компонент профильного обучения в старшей школе. Оренбург: ОГПУ 2014. 40с.
19. Овчаренко Н.Д., Кучина Е.А., Тузикова Р.В. Гистологические и гистохимические методы исследования: учебное пособие. Б: Алтайский государственный университет, 2013. 130с.
20. Окштейн И.Л. Цитология с основами естественных наук (введение в современную биологию "с нуля") Электронный ресурс:
21. Осипова И. А. Совершенствование профессиональной подготовки преподавателей физики на основе комплексного общефизического лабораторного практикума по волновой оптике. Тамбов, 2001. 164 с.
22. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М: Наука, 1981. 288 с.
23. Основные способы получения клеточного материала для цитологического исследования: эксфолиативный, пункционный,

- эндоскопический, биопсийный. Их общая характеристика. Приготовление стекол для получения мазков- URL: <https://pandia.ru/text/78/540/76714.php>(дата обращения: 09.03.2019).
- 24.Панин В.А., Бобылёв Ю.В., Зимулина Г.Д.Элективные курсы как средство дополнения и развития содержания профильных курсов в преподавании физики в педагогическом вузе. Т.: Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого 2017. 242с.
- 25.Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М: Издательство иностранной литературы, 1962. 962 с.
- 26.Письмо Минобразования России от 13 ноября 2003 г. № 14-51-227.13.
- 27.Раицкая Л.К. Дидактические и психологические основы применения технологий Веб 2.0. в высшем профессиональном образовании: монография. М.: МГОУ, 2011. 173 с.
- 28.Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А., Биологическая химия. М: Медицинское информационное агентство, 2008. 364с.
- 29.Симоненко В. Д. Общая и профессиональная педагогика М.: Вентана-Граф, 2005. 368 с.
- 30.Старикова, Л. Д. Касьянова Ю. С. Методика профессионального обучения: практикум. Екатеринбург: Изд-во РГПУ 2013. 131 с.
- 31.Таганович А.Д., Олецкий Э.И., Коневалова В.В., Биологическая химия. М: Высшая школа, 2016. 671с.
- 32.Теремов А.В. Элективные курсы в профильном обучении школьников М.: МПГУ 2017. 120 с.
- 33.Федорова Н.Б.Кузнецова О.В. Профильное обучение: элективные курсы для предпрофильной и профильной подготовки учеников общеобразовательной школыРязань: ; Ряз. гос. ун-т.им. С.А. Есенина 2011. 88с.

34. Фиксация цитологических мазков- URL:  
<https://megalektsii.ru/s30660t3.html> (дата обращения: 10.03.2019).
35. Федеральный закон «Об образовании в Российской Федерации» от 29 декабря 2012 года №273 Статья 16. (с изменением и дополнением, вступил в силу с 01.03.2022).
36. Функции лабораторных работ. Мир образования.  
<http://obrclub.ru/?p=51>.
37. Цитологическое исследование: когда, как и для чего делают анализы на цитологию. <https://www.kp.ru/guide/tsitologicheskoe-issledovanie.html>
38. Чернилевский Д. В. Дидактические технологии в высшей школе. М.: ЮНИТИДАНА 2002. 437 с
39. Ширшова Т.А. Полякова Т.А. Лабораторные работы как средство мотивации и активизации учебной деятельности учащихся. Омский научный вестник №4 2015. 188-190с.
40. Юденков В.Н., Школьный биологический эксперимент. В: УО « ВГУ им П. М. Машерова», 2010. 94 с.
41. 12 методов: проточная цитофлуориметрия.  
<https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-protocnaia-tsitofluorimetriia>

### Наука цитология

Организм человека и животных представляет собой целостную систему, в которой условно можно выделить ряд взаимосвязанных, взаимодействующих и соподчиненных иерархических уровней организации живой материи: клетки - ткани - морфофункциональные единицы органов - органы - системы органов.

Цитология (от греч. *kutos* - клетка, *logos* - учение) - наука о клетке. Она включает рассмотрение вопросов о развитии, строении и функциях клеток и их производных, а также механизмов воспроизведения и взаимодействия.

Цитология в последние годы обогатилась многими научными открытиями, внесшими существенный вклад в развитие биологических и медицинских наук и в практику здравоохранения. Новые данные о структуре ядра, его хромосомного аппарата легли в основу цитодиагностики наследственных заболеваний, опухолей, болезней крови и многих других болезней.

Раскрытие особенностей ультраструктуры и химического состава клеточных мембран является основой для понимания закономерностей взаимодействия клеток в тканевых системах, защитных реакциях и др.

Гистология с цитологией, как и другие биологические науки, решает главную задачу – выяснение источников развития, закономерностей гистогенеза, реактивности и регенерации тканей и в связи с этим - возможность целенаправленного воздействия на них.

Современные гистология, цитология вносят существенный вклад в разработку теоретических и прикладных аспектов современной медицины и биологии.

К фундаментальным теоретическим проблемам относятся:

- изучение гистогенеза как комплекса координированных во времени и пространстве процессов.
- изучение закономерностей адаптивной изменчивости клеток и тканей при действии неблагоприятных экологических факторов и в экстремальных условиях функционирования и развития, а также при трансплантации.
- разработка проблемы регенерации тканей после повреждающих воздействий.

- раскрытие механизмов молекулярно-генетической регуляции клеточной дифференцировки, наследования генетического дефекта развития систем человека, разработка методов генной терапии и трансплантации стволовых эмбриональных клеток.

Изучение строения органов в курсе анатомии базируется на данных гистологического и цитологического анализов. В настоящее время исследования клеточных и тканевых структур ведутся на субклеточном и молекулярном уровнях с применением биохимических цитохимических методов.

Знание нормальной структуры клеток, тканей и органов является необходимым условием для понимания механизмов их изменений в патологических условиях. Для современной медицины с ее направленностью на предупреждение и раннее выявление патологических процессов в организме знания о структурных основах и закономерностях обеспечения устойчивости и надежности живых систем (в том числе - тканей) особенно важны, поскольку прогрессивное развитие цивилизации неизбежно влечет за собой появление новых факторов, неблагоприятно воздействующих на животные организмы, в том числе и человека.

Тестовое задание «История формирования и этапы развития цитологии».

*с выбором одного правильного варианта ответа*

**1) Цитология – это наука о .....**

- А) строение и функционировании органов
- Б) строение и функционировании тканей
- В) строение и функционировании клеток\*

**2) В цитологии выделяют следующие отделы:**

- А) общая, частная \*
- Б) обширная, специализированная
- В) частная, многофункциональная
- Г) общая, узкая

**3) Развитие науки о клетке – цитологии связано с чем?**

- А) Открытием клетки
- Б) Новыми открытиями в гистологии
- В) Совершенствовании техники\*

**4) С чего начинается развитие цитологии?**

- А) Открытия «зародышей» и бактерий
- Б) Изобретения микроскопа \*
- В) Описания ядра клетки

**5) Что позволяют обнаружить внутри клетки цитохимические методы исследования?**

- А) Жиры, ферменты, белки, нуклеиновые кислоты\*
- Б) Минеральные соли
- В) Минеральные соли и воду
- Г) Только белки

**6) В чем заключается преимущество цитохимических методов?**

- А) Анализ разом исследует все клетки одного органа
- Б) Анализ можно проводить вне лаборатории
- В) Анализ проводят для определенных клеток, чувствителен\*

**7) К методам цитохимических реакций относятся:**

- А) Физический и Морфологический
- Б) Качественный и Количественный\*
- В) Химический и Сравнительный

**8) Метод исследования.....- интенсивность и расположение продукта можно определить под микроскопом визуально.**

- А) Количественный
- Б) Физический
- В) Качественный\*

**9) Принцип действия цитохимического метода:**

- А) Принцип выявления с помощью реакции с красителями\*
- Б) принцип выявления с помощью звуковых волн
- В) Принцип действия с помощью увеличительных приборов

**10) Выберите 3 правильных ответа. Фамилии ученых, внесших вклад в развитие цитологии:**

- А) Антони ван Левенгук
- Б) Н.И. Вавилов
- В) К. Линей
- Г) Т.Шванн и М. Шлейден
- Д) Ян Пуркинье
- Е) Л.Пастер

Техника безопасности при проведении лабораторной работы.

1. Работать необходимо аккуратно, соблюдая порядок проведения работы, изученный по раздаточному материалу. Работу проводят в вытяжном шкафу.
2. Подготовленный прибор покажите учителю.
3. Будьте особенно осторожны в обращении с концентрированными растворами кислот и щелочей, огнеопасными и ядовитыми веществами.
4. Берите вещества для опыта в минимально-необходимых количествах и только в чистую посуду.
5. Работать можно только в специальной одежде: халат и резиновые перчатки.
6. Участки кожи или одежды, на которые попал реактив, сначала промойте большим количеством воды, затем обработайте нейтрализующим веществом